

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DÉRIVÉS CARBOXYLIQUES DE L'AMIDON RICHE EN AMYLOSE
COMME EXCIPIENTS PHARMACEUTIQUES:
ASPECTS STRUCTURAUX ET FORMULATIONS D'ENZYMES
PANCRÉATIQUES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
MASSICOTTE LOUIS-PHILIPPE

JUIN 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier le professeur Mircea Alexandru Mateescu, mon directeur de recherche, pour m'avoir accepté dans son laboratoire et pour les bourses accordées durant mes études.

Je remercie tous mes collègues de laboratoire pour leurs collaborations ainsi qu'à Sylvain Canesi, Muriel Subirade et Mircea Alexandru Mateescu qui ont investi leur temps pour faire l'évaluation de ce mémoire.

J'adresse mes remerciements à la société Valeo inc. pour l'intérêt au projet et pour l'appui financier accordé au laboratoire ainsi qu'aux Fonds à l'Accessibilité et à la Réussite des Études (FARE) de l'UQAM pour les bourses d'excellence qu'ils m'ont octroyées.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|------------|
| Liste des figures | vi |
| Liste des tableaux | ix |
| Liste des abréviations | x |
| Contributions à la recherche réalisées au cours de la maîtrise | xi |
| Résumé | xii |
| | |
| Partie I - Introduction | 1 |
| Chapitre I - Amidon et dérivés d'amidon avec applications industrielles | 2 |
| 1.1 Amidon: Composé d'origine naturelle | 2 |
| 1.2 Amylose et l'amylopectine | 4 |
| 1.3 Amidon riche en amylose - Structure et propriétés | 6 |
| 1.4 Dérivés d'amidon | 7 |
| 1.4.1 Degré de substitution et degré de substitution molaire | 8 |
| 1.4.2 Le carboxyméthylamidon | 9 |
| 1.4.3 Le succinate amidon | 10 |
| 1.4.4 L'acétate amidon | 11 |
| 1.4.5 Le diéthylaminoéthylamidon | 12 |
| 1.4.6 L'éthyle et le méthylamidon | 13 |
| 1.5 Applications industrielles de l'amidon et ses dérivés | 15 |
| 1.6 Applications alimentaires | 16 |
| 1.7 Applications médicales | 16 |
| 1.7.1 Formulations pharmaceutiques pour administration orale et parentérale .. | 17 |
| 1.7.2 Formulations classiques, sans contrôle de la libération | 18 |
| 1.7.3 Formulations à libération immédiate | 19 |
| 1.7.4 Formulations à libération contrôlée | 20 |
| 1.7.5 Formulations à livraison contrôlée (action retardée) | 21 |

| | |
|--|-----------|
| 1.7.6 L'amidon et dérivés d'amidon comme excipients pharmaceutiques | 22 |
| 1.7.6.1 Agents liants | 22 |
| 1.7.6.2 Agents désagrégeant | 23 |
| 1.7.7 Amidon riche en amylose réticulé pour la libération contrôlée de médicament | 24 |
| 1.7.8 Système de libération de médicaments contrôlée enzymatiquement | 26 |
| 1.7.9 L'amidon riche en amylose hautement réticulé - agent liant et désagrégeant | 26 |
| 1.7.10 Dérivés de l'amidon riche en amylose réticulé comme matrices à libération contrôlée | 27 |
| 1.7.11 Le carboxyméthylamidon comme excipient pharmaceutique | 28 |
| Chapitre II - Le pancréas (Conditions physiologiques et pathologiques) | 30 |
| 2.1 Le pancréas - Fonctions endocrines et exocrines | 30 |
| 2.2 Les enzymes pancréatiques | 31 |
| 2.2.1 L' α -amylase | 34 |
| 2.2.2 La lipase | 36 |
| 2.2.3 La trypsine | 38 |
| 2.3 Les affections pancréatiques et les enzymes de remplacement | 41 |
| 2.3.1 La pancréatite aiguë | 43 |
| 2.3.2 La pancréatite chronique | 43 |
| 2.3.3 Formes commerciales d'enzymes de remplacement | 44 |
| Chapitre III - Présentation du projet | 46 |
| Partie II - Partie expérimentale | 50 |
| Chapitre IV - Article | 51 |
| 4.1 Dérivés carboxyliques de l'amidon riche en amylose comme excipients pharmaceutiques: Aspects structuraux et formulations d'enzymes pancréatiques | 52 |
| Chapitre V - Conclusion | 92 |

| | |
|--|----------------|
| Annexes | 96 |
| Carboxymethyl High Amylose Starch as Excipient Affording Resistance to Gastric Acidity for Bioactive Agents Oral Formulations. Transactions of 32 nd Meeting of Controlled Release Society, Miami, 2005 | 97 |
| Formulations pharmaceutiques à base d'amidon modifié. Congrès BioMed, Montréal, 2005 | 100 |
| Tri-enzyme gastro-resistant formulation based on carboxylated high amylose starch excipients. Transactions of 33 rd Meeting of Controlled Release Society, Vienne, 2006 | 102 |
| Formulations gastro-résistantes d'enzymes pancréatiques avec des excipients à base d'amidon modifié. Congrès BioMed, Montréal, 2006 | 105 |
| Bibliographie | 107 |

LISTE DES FIGURES

Partie Introductive

| | | |
|--------------|--|----|
| Figure 1.1: | Photomicrographies de granules d'amidon de diverses espèces (grossissement de 788x) (<i>tiré de Wurzburg, 1986</i>). | 3 |
| Figure 1.2: | Représentation schématique de l'amylose constitué d'unités d'anhydroglucose liées par des liaisons α -1,4-D-glucosidiques. | 5 |
| Figure 1.3: | Représentation schématique de l'amylopectine constituée d'unités d'anhydroglucose liées par des liaisons α -1,4-D-glucosidiques pour les parties non ramifiées et par des liaisons α -1,6-D-glucosidiques pour les ramifications. | 6 |
| Figure 1.4: | Représentation schématique du carboxyméthylamidon. | 9 |
| Figure 1.5: | Représentation schématique du succinate amidon. | 10 |
| Figure 1.6: | Représentation de l'acétate amidon. | 11 |
| Figure 1.7: | Représentation schématique du diéthylaminoéthylamidon. | 12 |
| Figure 1.8: | Représentation schématique (a) du méthylamidon et (b) de l'éthylamidon. | 14 |
| Figure 1.9: | Représentation schématique de la variation de la concentration du principe actif dans le sang suite à l'administration de comprimés à formulation de type classique sans contrôle de la libération. | 19 |
| Figure 1.10: | Représentation schématique de la variation de la concentration du principe actif dans le sang suite à l'administration d'un comprimé à libération immédiate. | 20 |
| Figure 1.11: | Représentation schématique de la variation de la concentration du principe actif dans le sang suite à l'administration d'un comprimé à libération contrôlée. | 21 |

| | |
|---|----|
| Figure 1.12: Représentation schématique de la variation de la concentration du principe actif dans le sang suite à l'administration d'un comprimé à libération retardée. | 22 |
| Figure 1.13: Représentation schématique de la réticulation pour la synthèse de l'amidon riche en amylose réticulé. | 24 |
| Figure 2.1: Représentation tridimensionnelle de l' α -amylase provenant de <i>Bacillus sp.</i> (EC 3.2.1.1). | 35 |
| Figure 2.2: Représentation tridimensionnelle de la lipase (EC 3.1.1.3). | 37 |
| Figure 2.3: Représentation tridimensionnelle de la trypsine pancréatique de rat (EC 3.4.21.4). | 40 |
| Figure 3.1: Présentation schématique des différentes étapes du projet. | 49 |

Partie Expérimentale

4.1 Dérivés carboxyliques de l'amidon riche en amylose comme excipients pharmaceutiques: Aspects structuraux et formulations d'enzymes pancréatiques.

| | |
|--|----|
| Scheme 1: Structures of (a) carboxymethyl high amylose starch and (b) succinate high amylose starch. | 81 |
| Figure 1: FTIR spectra of HAS and its (a) carboxymethyl and (b) succinate derivatives. | 82 |
| Figure 2: ^1H -NMR spectrum of CM-HAS. | 83 |
| Figure 3: DSC (a) and TGA (b) of HAS and its carboxymethyl and succinate derivatives. | 84 |
| Figure 4: Stability in SGF of α -amylase, lipase or trypsin formulated with (a) CM-HAS or (b) S-HAS. | 85 |

| | |
|--|----|
| Figure 5: SDS-PAGE electrophoretic patterns of (a) α -amylase, (b) lipase and (c) trypsin, in native form or in tablets formulated with CM-HAS or S-HAS. | 86 |
| Figure 6: Stability in SGF of α -amylase, lipase and trypsin formulated together with (a) CM-HAS or (b) S-HAS. | 87 |
| Figure 7: Delivery in SIF of α -amylase, lipase or trypsin formulated individually with (a) CM-HAS or (b) S-HAS. | 88 |
| Figure 8: Delivery in SIF of α -amylase, lipase and trypsin formulated together with (a) CM-HAS or (b) S-HAS. | 89 |
| Figure 9: Delivery in SIF of bi-enzymatic formulations with (a) CM-HAS or (b) S-HAS. | 90 |
| Figure 10: Tablet loading of α -amylase, lipase or trypsin formulated with (a) CM-HAS or (b) S-HAS. | 91 |

LISTE DES TABLEAUX

Partie Introductive

| | |
|---|----|
| Tableau 2.1: Action de certaines enzymes sécrétées par le système digestif des mammifères (<i>selon Eckert et al., 1999</i>). | 33 |
|---|----|

Partie Expérimentale

4.1 Dérivés carboxyliques de l'amidon riche en amylose comme excipients pharmaceutiques: Aspects structuraux et formulations d'enzymes pancréatiques.

| | |
|---|----|
| Tableau 1: FTIR of HAS and its carboxymethyl and succinate derivatives. | 77 |
| Tableau 2: DSC analysis of HAS and of its carboxymethyl and succinate derivatives. | 77 |
| Tableau 3: TGA of HAS and its carboxymethyl and succinate derivatives. | 77 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|-------------|--|
| AAS | <i>Atomic Absorption Spectroscopy</i> |
| Ac-Amidon | Acétate Amidon |
| ARA | Amidon Riche en Amylose |
| ARA-R | Amidon Riche en Amylose Réticulé |
| BAEE | N α -Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester |
| CM-Amidon | Carboxyméthylamidon |
| CM-ARA | Carboxyméthylamidon Riche en Amylose |
| DEAE-Amidon | Diéthylaminoéthylamidon |
| DNS | Acide 3,5-dinitrosalicylique |
| DS | Degré de Substitution |
| DSC | <i>Differential Scanning Calorimetry</i> |
| DSM | Degré de Substitution Molaire |
| É-Amidon | Éthylamidon |
| FTIR | Spectroscopie Infrarouge à Transformée Fourier |
| M-Amidon | Méthylamidon |
| S-Amidon | Succinate Amidon |
| S-ARA | Succinate Amidon Riche en Amylose |
| SDS-PAGE | <i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> |
| SGF | <i>Simulated Gastric Fluid</i> |
| SIF | <i>Simulated Intestinal Fluid</i> |
| TGA | <i>Thermogravimetric Analysis</i> |

CONTRIBUTIONS À LA RECHERCHE RÉALISÉES DURANT LA MAÎTRISE

Article avec comité de lecture

Louis Philippe Massicotte, Wilms Emmanuel Baille, Mircea Alexandru Mateescu – Carboxylated high amylose starch as pharmaceutical excipients. Structural insights and formulation of pancreatic enzymes. Article soumis pour publication dans: European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.

Conférences avec arbitrage (texte intégral ou abrégé publié)

C. Calinescu, L. Massicotte, J. Mulhbach, M. Mateescu – Carboxymethyl High Amylose Starch as Excipient Affording Resistance to Gastric Acidity for Bioactive Agents Oral Formulations. UQÀM, Canada. Transaction of 32nd Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. #445

Louis-Philippe Massicotte, Jérôme Mulhbach, Carmen Calinescu, Mircea Alexandru Mateescu – Formulations pharmaceutiques à base d'amidon modifié. UQÀM, Canada. 1^{er} Colloque annuel BioMed, 2005. #22

L. Massicotte, M. A. Mateescu – Tri-enzyme gastroresistant formulation based on carboxylated high amylose starch excipients. UQÀM, Canada. The 33rd Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society. #899

Louis-Philippe Massicotte, Mircea Alexandru Mateescu – Formulations gastro-résistantes d'enzymes pancréatiques avec des excipients à base d'amidon modifié. UQÀM, Canada. 2^e Colloque annuel BioMed, 2006. #28

RÉSUMÉ

L'amidon est un produit d'origine naturelle, abondant et peu dispendieux. Pour ces raisons, son utilisation industrielle est très répandue. En pharmaceutique, un grand nombre de matériaux (naturels ou synthétiques) sont présentement utilisés comme excipients dans les systèmes de livraison de médicaments. Par exemple, l'amidon est largement utilisé comme agent de remplissage, agent liant ou agent désagrégeant. Par ailleurs, les dérivés de l'amidon riche en amylose ont déjà été proposés comme matrice pour la libération contrôlée de médicaments. L'objectif principal du projet a été de réaliser des modifications sur l'amidon riche en amylose (Hylon VII) à l'aide d'acide monochloroacétique ainsi qu'avec l'anhydride succinique pour obtenir respectivement de l'amidon riche en amylose carboxyméthylé (CM-ARA) et du succinate amidon riche en amylose (S-ARA). Par la suite, des études ont été réalisées sur les propriétés et caractéristiques physico-chimiques de ces deux excipients [degré de substitution (DS), analyses par spectroscopie d'absorption atomique (AAS), par infrarouge (FTIR), par résonance magnétique nucléaire (RMN), par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et par thermogravimétrie (TGA)]. Ensuite, les deux dérivés ont été utilisés comme matrices pour la protection d'enzymes pancréatiques (α -amylase, lipase et trypsine) durant le passage gastrique et pour la libération de ces mêmes enzymes au niveau de l'intestin. Ces études ont eu pour but de permettre une administration par voie orale d'enzymes de remplacement pour le traitement de la pancréatite. Les excipients CM-ARA et S-ARA ont montré *in vitro* une protection significative de l'activité enzymatique des enzymes pancréatiques étudiées après une incubation dans des conditions simulant l'acidité gastrique (SGF). Les formulations trienzymatiques à base de CM-ARA préservent 72 % de l'activité enzymatique globale (trois enzymes), tandis que les formulations à base de S-ARA préservent 77 % de l'activité de ces mêmes enzymes. Ces résultats contrastent avec les observations faites sur les enzymes libres qui montrent une dénaturation presque complète après seulement quelques minutes d'incubation dans le milieu SGF. Les cinétiques de dissolution montrent des temps semblables (180 min pour le CM-ARA et 170 min pour le S-ARA) pour la libération de 75 % de l'activité totale restante des enzymes dans le milieu simulant le fluide intestinal (SIF) après incubation d'une heure dans le SGF. La capacité de chargement des matrices en enzymes est dépendante de l'enzyme utilisée. L'activité enzymatique libérée augmente avec la charge en enzyme jusqu'à 70-80 % dans les formulations avec l'un ou l'autre des deux excipients. Un avantage de ces formulations est que la protection contre l'acidité gastrique est due aux matrices carboxylées, sans enrobage entérique. Les propriétés au niveau de la protection des enzymes, de la capacité à libérer les enzymes dans le fluide intestinal et de la capacité élevée de chargement, font de ces matrices des candidates pour leur utilisation dans le milieu pharmaceutique.

Mots clés: Alpha-amylase, Carboxyméthylamidon riche en amylose, Lipase, Pancréatite, Succinate amidon riche en amylose, Systèmes de livraison par voie orale, Trypsine.

PARTIE I

INTRODUCTION

CHAPITRE I

AMIDON ET DÉRIVÉS D'AMIDON AVEC APPLICATIONS INDUSTRIELLES

1.1 Amidon: Composé d'origine naturelle

L'amidon est le second plus abondant polysaccharide (le premier étant la cellulose) et constitue une réserve importante de carbohydrates chez les plantes. L'amidon provient du glucose généré par la photosynthèse et il est généralement entreposé sous forme de granules ayant un diamètre de 1 à 100 μm ou plus (Wurzburg, 1986). L'amidon est entreposé surtout dans les graines, les tubercules, les fruits et les racines des plantes (Seymour et Carraher, 1981). Du point de vue structurel, l'amidon diffère de la cellulose de deux façons essentielles: i) les cycles de glucose de l'amidon sont liés entre eux par des liens éther entre les carbones 1 et 4 de type α -glucosidique au lieu de β -glucosidique, et ii) dans le cas de l'amidon, une quantité considérable de branchements est observable au niveau du carbone 6. Cependant, comme pour la cellulose, une hydrolyse complète de l'amidon produit du D-glucose (Stevens, 1990).

Les granules d'amidon sont insolubles dans l'eau froide et il existe de grandes différences entre leurs tailles dépendamment de la source (Figure 1.1). Par exemple, les granules d'amidon provenant des grains de riz ont une forme polygonale. Ils mesurent entre 3 et 8 μm de diamètre et ils ont tendance à s'agglomérer en grappe. Les granules d'amidon provenant du maïs ont aussi une forme polygonale mais ils peuvent aussi posséder une forme ronde. Leurs tailles se situent entre 5 et 25 μm de diamètre (15 μm

en moyenne). Les granules d'amidon du tapioca ont habituellement une forme ronde tronquée à un bout. Ils ont en moyenne une taille de 20 μm mais qui peut varier entre 5 μm et 35 μm de diamètre. L'amidon provenant du blé forme des granules ayant une forme aplatie, ronde ou elliptique. Ceux-ci tendent à s'agréger en grappes de deux gammes de tailles: 2 à 10 μm et 20 à 35 μm . L'amidon de pomme de terre possède les plus gros granules de tous les amidons commerciaux. Ils ont une forme ovale et des tailles de 15 à 100 μm (Wurzburg, 1986).

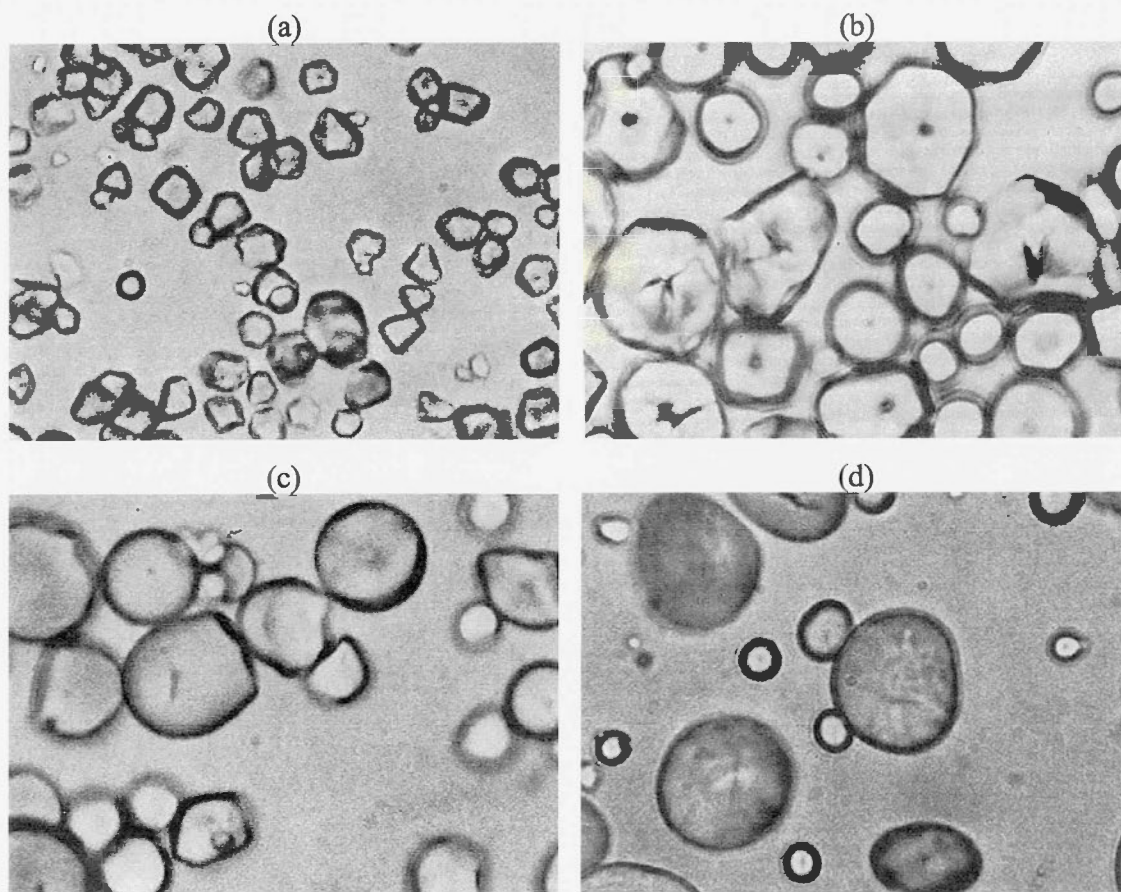


Figure 1.1: Photomicrographies de granules d'amidon de diverses espèces (grossissement de 788x): granules d'amidon provenant du (a) riz, (b) tapioca, (c) maïs et (d) blé (tiré de Wurzburg, 1986).

1.2 Amylose et l'amylopectine

L'amidon est un polymère qui est composé d'amylose et d'amylopectine. Ces deux composants peuvent être séparés en raison de leurs différents degrés de solubilité. L'amylose a une structure principalement non ramifiée, constituée d'unités de D-glucose (500 à 20 000, dépendamment de la source) liées entre elles par des liens α -1,4 (Figure 1.2) (Buléon et al., 1998). L'amylose possède une masse moléculaire entre 30 000 et 1 million. Cependant, des masses de 200 000 et de 300 000 semblent être les limites supérieures courantes (Stevens, 1990).

L'amylose peut avoir une forme étendue (rayon hydrodynamique de 7-22 nm) mais généralement, il tend à former soit des hélices gauches simples et peu flexibles ou des zones de jonction en doubles hélices gauches parallèles encore moins flexibles (Imberty et al., 1988). Une hélice simple d'amylose possède une liaison hydrogène entre l'oxygène 2 et l'oxygène 6 sur la surface externe de l'hélice avec les oxygènes de l'anneau du sucre pointant vers l'intérieur. La prédominance des hélices simples dans les zones amorphes génère la structure de type V. L'hélice se comporte de façon similaire aux cyclodextrines en possédant une surface interne relativement hydrophobe qui retient une spirale de molécules d'eau. Celles-ci peuvent facilement être remplacées par un liquide hydrophobe ou par des molécules aromatiques.

Lorsque l'amylose est exposé à l'eau ou à d'autres solvants, il subit une cristallisation donnant des formes V (hélice simple) et aussi des formes B (doubles hélices). Ce phénomène est observable par des études de diffraction aux rayons X et par spectroscopie RMN du ^{13}C . La structure V montre une hélice de six résidus glucose se répétant sur approximativement 0,8 nm, formant une structure d'un diamètre de 1,8 nm et vide au centre. Comme évoqué plus tôt, cet espace peut accommoder au moins une molécule d'eau par deux résidus de glucose. Entre les résidus adjacents de la chaîne, il y a la présence de liaisons hydrogène entre l'hydroxyle de l'oxygène-2 et l'oxygène-3 ainsi

que la présence d'autres liens hydrogène entre l'hydroxyle de l'oxygène 6 du résidu 1 et l'oxygène 2 du résidu 7. Cette conformation est présente dans toutes les structures V (Walton et Blackwell, 1973). L'amylose peut aussi adopter une autre conformation: la forme B. Cette structure à hélice double, a un diamètre de 1,04 nm avec les résidus de chaque tour successif liés par des liaisons hydrogène par l'entremise d'une molécule d'eau entre les résidus 1 et 7. Les liaisons hydrogène entre l'hydroxyle de l'oxygène 2 et l'oxygène 3 sont aussi présentes dans cette structure (Walton et Blackwell, 1973).

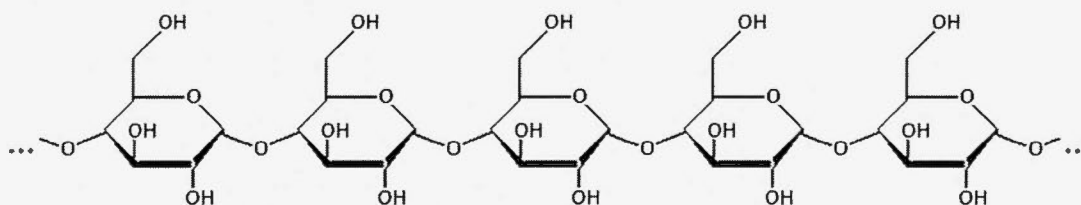


Figure 1.2: Représentation schématique de l'amylose constitué d'unités d'anhydroglucose liées par des liaisons α -1,4-D-glucosidiques.

À l'opposé, l'amylopectine est très branchée (au niveau des carbones 6) (Figure 1.3) et possède une masse moléculaire au dessus de 1 million. Il a été suggéré que les chaînes sont composées de 20 à 25 unités de glucose liées par des liaisons α -1,4, comme dans l'amylose, mais avec des chaînes connectées entre elles par des liens α -1,6. Dans l'amidon d'origine naturelle, il y a habituellement environ trois fois plus d'amylopectine que d'amylose, bien que les proportions peuvent varier grandement chez certaines espèces (Stevens, 1990).

L'amylopectine contient quelques millions de résidus dont environ 5 % sont des branchements. Il y a habituellement plus de branchements vers l'extérieur de la structure (chaînes-A) qu'il y a de branchements vers l'intérieur de celle-ci (chaîne-B). Il y a toutefois qu'une seule chaîne qui contient le groupement réducteur (chaîne-C).

L'amylopectine a une structure compacte avec un rayon hydrodynamique de 21-75 nm (Parker et Ring, 2001). Les molécules sont orientées de façon radiale dans le granule avec comme conséquence la formation de régions concentriques alternant entre des structures amorphes et cristallines. Les structures cristallines consistent en des doubles hélices gauches parallèles composées de six résidus par tour.

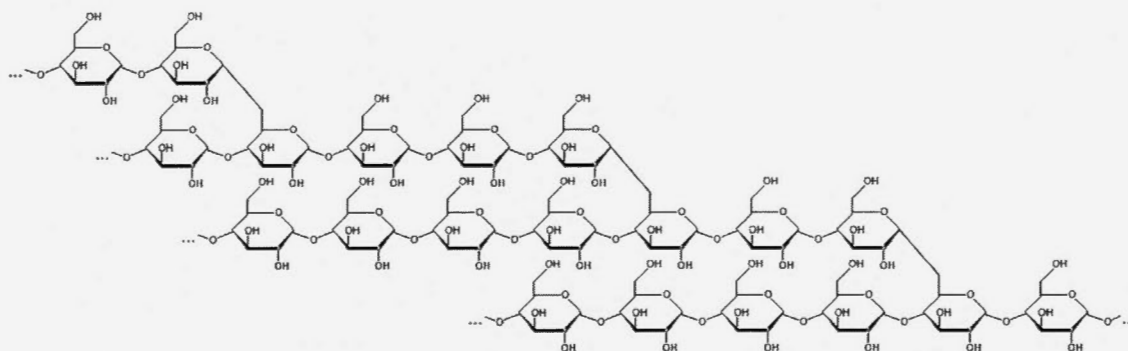


Figure 1.3: Représentation schématique de l'amylopectine constituée d'unités d'anhydroglucose liées par des liaisons α -1,4-D-glucosidiques pour les parties non ramifiées et par des liaisons α -1,6-D-glucosidiques pour les ramifications.

1.3 Amidon riche en amylose – Structure et propriétés

Indépendamment de la source, tous les amidons sont composés d'amylose et d'amylopectine dans différents ratios. Puisque l'amylopectine est un polymère significativement plus large que l'amylose, il peut associer beaucoup plus d'eau lorsqu'il est en solution et par conséquent il joue une plus grande contribution au niveau de la viscosité que l'amylose. Dans les suspensions, qui sont assez visqueuses à cause de leurs hautes concentrations en amidon hydraté, l'effet de l'amylopectine est souvent indésirable. À l'opposé, l'amylose contribue à une faible viscosité en solution, car à cause de sa structure non ramifiée, l'amylose tend à s'associer de façon plus compacte en

empilements d'hélices. Ce phénomène est responsable de la formation des gels (Zallie, 1989).

L'amidon riche en amylose (ARA) est produit par la sélection des plantes avec un ratio modifié d'amylose et d'amylopectine. La plupart des amidons provenant des plantes courantes telles que le maïs, le blé, la pomme de terre et le tapioca contiennent entre 18 et 28 % d'amylose (Wurzburg, 1986). Le blé et le maïs se situent dans la portion élevée de cette gamme tandis que la pomme de terre et le tapioca se trouvent dans la portion plus faible de celle-ci.

L'amidon riche en amylose contient au-dessus de 50 % d'amylose. Trois types commerciaux sont produits: classe V (50 % amylose), classe VII (70 % amylose) et classe IX (90 % amylose) (Sajilata et al., 2006). L'amidon riche en amylose est très cristallin et requière de hautes températures ou pressions pour atteindre la gélatinisation complète. Ce type d'amidon est employé en confiserie pour sa capacité à former des films robustes et des gels.

1.4 Dérivés d'amidon

L'utilisation de l'amidon comme matériau de base pour la synthèse de dérivés a été considérée depuis plusieurs décennies. L'amidon est abondant, il est peu coûteux et possède un degré de pureté relativement élevé. Une approche qui a reçu un bon succès commercial a été la production d'un amidon partiellement éthérifié. Ce succès est dû au fait qu'il est facile d'alkyler l'amidon sans le dégrader et aussi en raison de la stabilité du lien éther dans les produits obtenus (Hjermstad, 1973).

En général, les amidons modifiés utilisés dans l'alimentation sont employés pour trois raisons. D'abord, ils fournissent des attributs fonctionnels nécessaires pour des

applications alimentaires que les amidons naturels ne peuvent pas fournir. Par exemple, dans la préparation de desserts, l'amidon fournit la force d'épaississement, une texture crémeuse et la simplicité si c'est un mélange instantané. Dans d'autres applications, l'amidon modifié peut fournir un éventail de fonctions liées à la désintégration, à l'augmentation ou la diminution de l'humidité, à la production de certaines textures (exemple: douces ou pulpeuses), au développement d'un enduit mou ou croquant, ou à la stabilisation une émulsion. En second lieu, l'amidon est abondant et aisément disponible. Troisièmement, l'amidon peut fournir un avantage économique dans beaucoup d'applications où les produits ont un prix élevé (Zallie, 1989).

Dans un sens large, n'importe quel produit dérivé de l'amidon dont les propriétés chimiques ou physiques ont été modifiées, peut être considéré comme étant de l'amidon modifié (Wurzburg, 1986).

1.4.1 Degré de substitution et degré de substitution molaire

Le degré de substitution molaire (DSM) est défini comme le nombre moyen de groupements ajoutés par unité d'anhydroglucose. Il est déterminé à partir du nombre total de groupements hydroxyle présents sur la molécule (Ho et al., 1972).

Différemment, le degré de substitution (DS) est défini comme étant la proportion d'unités d'anhydroglucose substituées par rapport au nombre total d'unités d'anhydroglucose. Il est déterminé par le nombre d'unités de glucose non substitué après une hydrolyse complète d'une substance (Ho et al., 1972).

À partir de ces définitions, le DSM ne peut pas être plus faible que le DS. Dans le cas où il y a seulement des monosubstitutions (chaque unité d'anhydroglucose porte un seul groupement ajouté) le DSM est équivalent au DS.

1.4.2 Le carboxyméthylamidon

La première synthèse de carboxyméthylamidon (CM-amidon) (Figure 1.4) a été effectuée en 1924, en faisant réagir de l'amidon dans une solution alcaline (40 % NaOH) avec du monochloroacétate sodique (Chowhury, 1924). Cette modification augmentait progressivement la solubilité de l'amidon avec l'accroissement du degré de substitution. À des degrés de substitution élevés, l'amidon devient soluble dans l'eau froide et forme une solution qui est claire (Hofreiter, 1986).

L'acide monochloroacétique est un produit solide cristallin avec un point de fusion de 63 °C. Ce produit est corrosif et soluble dans l'eau, alcools et benzène. La modification de l'amidon se fait préférentiellement sur l'oxygène lié au carbone 2 par une réaction de substitution nucléophile d'ordre deux (S_N2) (Kragten et al., 1992).

Le CM-amidon n'est pas nocif pour les humains, sauf dans les cas d'ingestion massive du produit [par exemple: 60 g / jour à un degré de substitution molaire de 0,4 - 0,5 cause des diarrhées (Wang et al., 1950)] et par conséquent il peut être utilisé pour des applications pharmaceutiques.

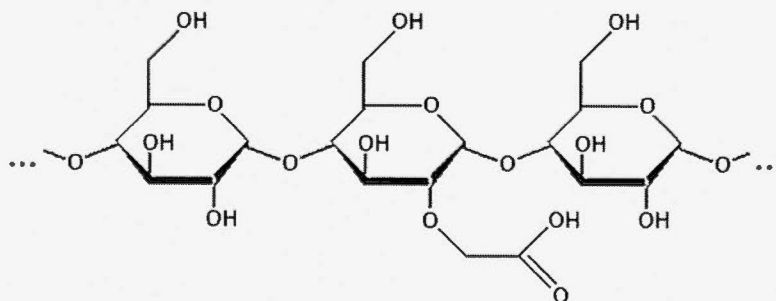


Figure 1.4: Représentation schématique du carboxyméthylamidon.

1.4.3 Le succinate amidon

Le succinate amidon (S-amidon) (Figure 1.5) a tendance à gonfler dans l'eau à température ambiante. À un pH au dessus de 7,5, la dé-estérification peut se produire, ce qui peut poser un problème, car les bénéfices dus aux groupements succinate sur l'amidon, peuvent être perdus. Le S-amidon offre une gamme de propriétés désirables. Celles-ci incluent une faible température de gélatinisation, un pouvoir épaississant élevé, une stabilité de la viscosité à faible température et une clarté pour la cuisson. Cet amidon possède aussi de bonnes propriétés pour former des films (Trubiano, 1986).

Dans l'industrie alimentaire, ce dérivé d'amidon peut être utilisé comme agent liant et agent épaississant dans les soupes, les produits réfrigérés et les produits en conserves. Dans l'industrie pharmaceutique, ce genre d'amidon a été recommandé comme agent désagrégeant (Trubiano, 1986). Finalement, dans l'industrie du papier, le S-amidon de faible viscosité peut être utilisé comme agent de surface (un procédé où un agent sous forme de film est appliqué à la surface du papier séché ou partiellement séché, habituellement pour le rendre moins absorbant) (Trubiano, 1986).

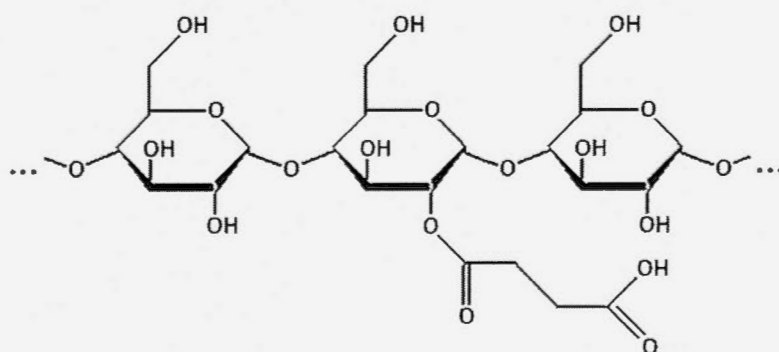


Figure 1.5: Représentation schématique du succinate amidon.

1.4.4 L'acétate amidon

L'acétate amidon (Ac-amidon) (Figure 1.6) est connu depuis plus d'une centaine d'années. Une méthode de synthèse largement utilisée en laboratoire repose sur la réaction de granules d'amidon avec l'anhydride acétique dans un milieu composé de pyridine en absence d'eau. Les dérivés hautement substitués avec un DSM de 2 à 3, ont été d'un grand intérêt à cause de leur solubilité dans les solvants tels que l'acétone et le chloroforme ainsi qu'à cause de leur thermoplasticité. Ils ont aussi joué un rôle dans l'étude des propriétés physiques de l'amidon, des fibres d'amylose et dans l'étude des films (Jarowenko, 1986).

L'Ac-amidon est moins hydrophile que la plupart des amidons modifiés à cause de la nature moins polaire (plus hydrophobe) du substituant acétyl (Pohja et al., 2004). Ce dérivé a été utilisé pour la formation (par compression directe) de comprimés ayant des propriétés de libération continue en éléments actifs (Korhonen et al., 2000). D'autres recherches ont montré que le relargage du principe actif est dépendant du DS de la matrice ainsi que de la concentration de celle-ci (w/w) dans le comprimé (Pohja et al., 2004).

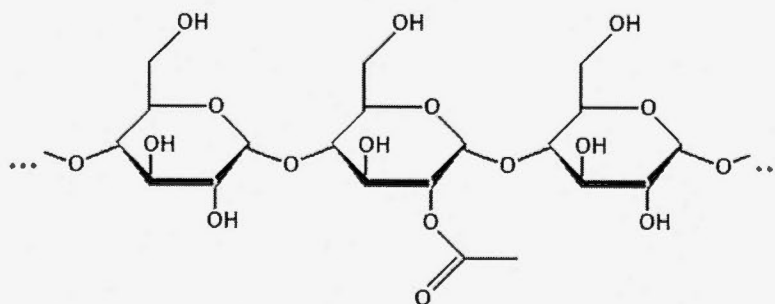


Figure 1.6: Représentation schématique de l'acétate amidon.

Récemment, en altérant la porosité et le nombre relatif de groupements qui génèrent un caractère plus hydrophobe aux comprimés, des recherches ont démontré que l'Ac-amidon peut être utilisé dans des formulations allant de la libération immédiate à la libération contrôlée de différents polysaccharides et oligosaccharides (Mäkia et al., 2006). En effet, de nombreux récepteurs peuvent se lier à des séquences d'oligosaccharides spécifiques sur les glycoprotéines, les glycolipides et les polysaccharides. Ces récepteurs sont impliqués dans les interactions hôte-microorganismes (infections) et dans les mécanismes de l'inflammation et de l'immunité (Toppila et al., 1999; Feizi et al., 2003).

1.4.5 Le diéthylaminoéthylamidon

Lors de la synthèse d'amidon cationique, la substitution se fait principalement sur le groupement hydroxyle du carbone 2 (Shiroza et Furihata, 1982). Pour le diéthylaminoéthylamidon (DEAE-amidon) (Figure 1.7) et dans une réaction aqueuse, 43 % des groupements diéthylaminoéthyle sont situés sur le carbone 2, 18 % sur le carbone 3 et 39 % sur le carbone 6. Cette réaction se fait aussi plus facilement sur l'amylose que sur l'amylopectine lorsque le DS est faible (Roberts et Rowland, 1967).

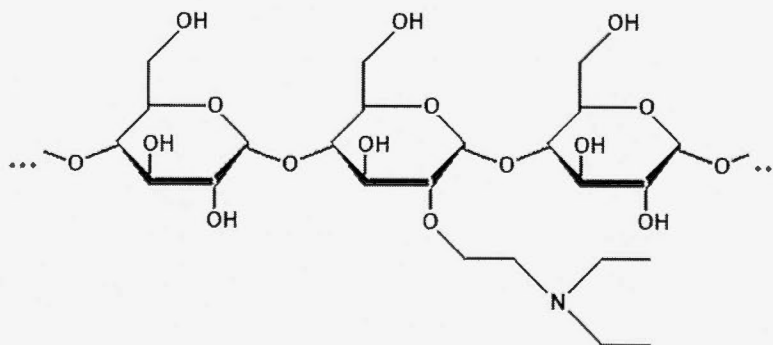


Figure 1.7: Représentation schématique du diéthylaminoéthyle amidon.

À l'heure actuelle, les dérivés d'amidon qui sont intéressants au niveau commercial sont les éthers de l'amidon avec des groupements alkylamine tertiaires et alkylammonium quaternaires. Leurs principaux intérêts se trouvent dans leurs affinités pour les substances chargées négativement (Solarek, 1986). Dans la fabrication du papier, la fibre de cellulose est la matière première principale et les amidons cationiques sont largement utilisés comme agents liants, comme agents de surface, agents pour retenir les pigments afin de permettre une meilleure impression en réduisant la pénétration de l'encre dans le papier (BeMiller, 1973). Les amidons cationiques améliorent la force du papier en renforçant les liens des fibres par un processus de liaisons ioniques et en ajoutant des liaisons hydrogène. La cationisation de l'amidon peut être combinée avec d'autres traitements tels que l'hydrolyse acide, la dextrinisation (hydrolyse partielle) ou l'oxydation afin de produire des produits de différentes viscosités (Solarek, 1986).

1.4.6 L'éthyle et le méthylamidon

Le méthylamidon (M-amidon) (Figure 1.8a) comme l'éthylamidon (É-amidon) (Figure 1.8b) (leurs procédés de préparation et leurs propriétés étant très semblables), sont très stables et leurs utilités ont été démontrées pour élucider la structure des polysaccharides. L'É-amidon est soluble dans l'eau froide à un DSM de 1,5 (1,0 pour le M-Amidon). À un DSM plus élevé, ces éthers d'amidon deviennent solubles dans les solvants tels que l'acétone, l'alcool d'amyle ($C_5H_{11}OH$), le butanol et le toluène (Hofreiter, 1986).

Les principales utilisations du M-amidon se résument à être des agents épaississants, des colloïdes protecteurs, des agents de suspension et d'être des composants dans les détergents (Roberts et Rowland, 1967). Plus récemment, ils ont aussi été utilisés dans l'industrie du textile afin d'aider au traitement, à l'impression et à

la finition des vêtements ainsi que comme absorbant de liquides physiologiques (Samland et Schulz, 1967; Klein et al., 1969; Twardowski et al., 1976; Holst et al., 1978).

Les principales utilisations de l'É-amidon se trouvent dans l'industrie du papier comme composant dans les formulations avec des polymères synthétiques de même qu'avec le polyvinylalcool dans les pigments adhésifs pour le papier d'électrophotographie [une technique développée par Chester Carlson en 1938 (breveté en 1942) et utilisée dans les imprimantes laser, les télécopieurs et les photocopieurs où une charge électrostatique est placée sur le papier], comme agent liant dans les pigments de copolymère acrylamide-styrène pour des enduits, comme composantes dans le papier pour impression de haute qualité, comme agent liant pour des enduits antirouille, ainsi que dans d'autres enduits spécialisés (Walters et Shillingbury, 1971; Green et al., 1972; Allen et al., 1975; Mani et al., 1975; Craig et al., 1976). L'utilisation d'un É-amidon cationique a aussi été suggérée pour la formation d'enduits conducteurs (Yoshida, 1974).

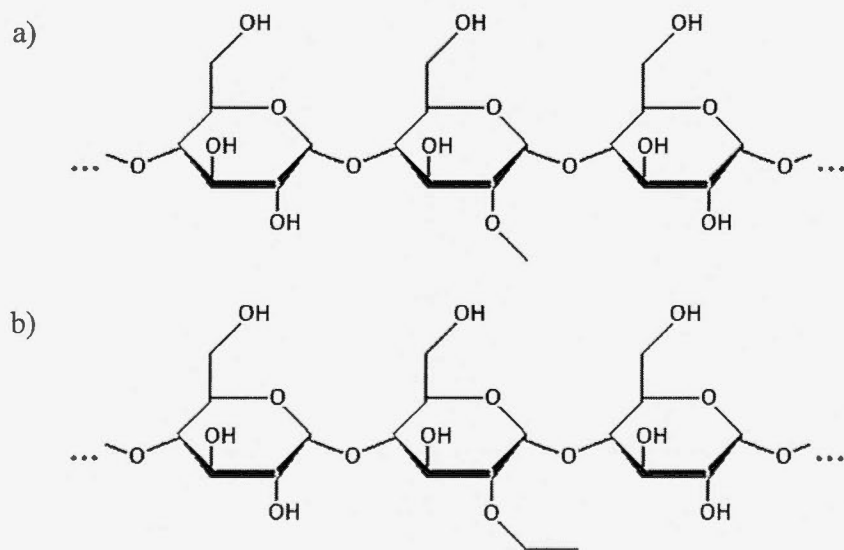


Figure 1.8: Représentation schématique (a) du méthylamidon et (b) de l'éthylamidon.

1.5 Applications industrielles de l'amidon et de ses dérivés

De nombreuses industries sont basées sur l'utilisation des polysaccharides, plus particulièrement de l'amidon et de la cellulose. Les dérivés d'amidon sont utilisés dans l'industrie du textile, du papier et dans l'industrie du nettoyage. Dans le cas des fabricants de textiles, l'amidon est utilisé pour rendre la fibre de coton et de nylon plus solide ainsi qu'améliorer leur résistance face à l'abrasion (MacGregor et Greenwood, 1980). Par exemple, lorsque le nylon 610 (dérivé de l'hexaméthylène diamine et de l'acide sébacique) réagit avec le dérivé amidon-poly(glycidyl méthacrylate) en présence de triéthylamine, son élasticité et sa résistance deviennent beaucoup plus élevées que celles du nylon 610 pur (Gwan et al., 2004). Dans l'impression du textile, les dérivés d'amidon retiennent les teintures dans la bonne position sur les vêtements et préviennent la diffusion des couleurs (après l'impression, ces dérivés d'amidon sont enlevés). L'amidon peut aussi être utilisé pour donner un lustre et une brillance aux fils utilisés en couture ainsi que pour rendre le linge plus ferme et donner une meilleure finition aux vêtements et à certain type de textile (MacGregor et Greenwood, 1980).

Dans l'industrie papetière, l'amidon joue un rôle secondaire comparé à la cellulose puisque ce sont les fibres entrelacées de cellulose qui forment la base du papier. Cependant, lorsque ces fibres sont mises dans une solution aqueuse et broyées mécaniquement, leur résistance aux déchirures est diminuée; l'ajout d'un dérivé d'amidon à ce stade peut être utilisé pour pallier ce problème. D'autant plus qu'une fois mis sous forme de feuille, les dérivés d'amidon en solution peuvent être utilisés comme agents de surface pour consolider les fibres en superficie avec celles plus profondes dans le papier, améliorant ainsi la résistance et l'aspect extérieur du papier (MacGregor et Greenwood, 1980). Finalement, les produits de l'amidon peuvent servir de revêtement (amylose xanthate) afin de donner une plus grande résistance au papier (sec et mouillé) et une meilleure impression (Russell et al., 1964; Tee-Pak Inc., 1966).

1.6 Applications alimentaires

Comme pour les fibres présentes dans l'alimentation, les amidons résistants à l'hydrolyse enzymatique au niveau du petit intestin ne sont que faiblement digérés dans la lumière de celui-ci mais peuvent cependant être fermentés dans le gros intestin (Baghurst et al., 1996). Quand l'amidon modifié échappe à la digestion, il devient une partie importante des carbohydrates qui seront métabolisés par les bactéries dans le côlon. Comme ces microorganismes fermentent les carbohydrates non digérés, ils libèrent de courtes chaînes d'acide gras (incluant de l'acétate, du propionate et du butyrate), ce qui diminue le pH du côlon. Comparés aux fibres alimentaires, les amidons modifiés produisent une proportion plus élevée de butyrate (Baghurst et al., 1996). Le butyrate est considéré comme jouant un rôle dans la croissance et la régulation des cellules intestinales en supprimant les cellules tumorales et en réduisant la prolifération des cellules mucosales du côlon (Cassidy et al., 1994). De plus, les polysaccharides fermentables fourniraient une protection contre les produits nocifs du métabolisme tels que l'ammoniaque et les phénols. Des amidons résistants auraient aussi été utilisés comme prébiotiques (Baghurst et al., 1996) qui sont définis comme des ingrédients dans la nourriture étant non digestibles, mais affectant son hôte en stimulant sélectivement la croissance ou l'activité de certaines bactéries dans le côlon, et par conséquent, promouvoit la santé de l'hôte (Gibson et Robertfroid, 1995).

1.7 Applications médicales

L'amylose possède plusieurs propriétés qui le rendent utile dans la production de matériaux médicaux et dans l'industrie pharmaceutique. Par exemple, des filaments et des fibres non toxiques pour des sutures médicales peuvent être faites à partir de l'amylose et de l'hydroxypropylamylose. Par ailleurs, des éponges à base d'amylose peuvent être utilisées lors d'opérations chirurgicales, car elles possèdent une bonne

capacité d'absorption de l'eau tout en étant capables d'être résorbées par l'organisme. Les complexes amylose-iode ont été rapportés comme ayant une forte activité antibactérienne contre les microorganismes Gram positifs et Gram négatifs. Le sulfate d'amylose est utilisé pour le traitement des ulcères d'estomac (Ravin et al., 1962). Ce composé ainsi que le carboxyméthylamylose augmentent la capacité de certains antibiotiques (ceux à caractère basique) à entrer dans le système lymphatique, les rendant appropriés aux applications parentérales (Herold et al., 1959). L'amidon résistant à l'action de l'amylase a été utilisé pour réduire les pertes de fluides et pour réduire la durée de la diarrhée chez les adolescents et adultes atteints du choléra (Ramakrishna et al., 2000).

Dans l'industrie pharmaceutique, ses propriétés à former des complexes lui permettent d'être utilisé pour la formulation et l'encapsulation de composés ou molécules insolubles dans l'eau [exemple: vitamine A palmitate (Anderson, 1967; Mehlretter et Roth, 1968) ou l'acide linoléique (Lalush et al., 2005)]. De plus, l'amylose possède aussi des propriétés qui le rendent utile comme agent liant dans la compression directe de poudres lors de la préparation de comprimés monolithiques (Rutenberg et Jarowenko, 1962). Par exemple, l'amylose réticulé a déjà été utilisé comme agent liant (Dumoulin et al., 1994; Cartilier et al., 1997). Plus récemment, l'amylose a également été utilisé pour la livraison d'agents bioactifs afin de traiter plusieurs maladies affectant le côlon ainsi que pour la livraison de protéines et de peptides pour l'absorption systémique à ce même endroit (Chourasia et Jain, 2004).

1.7.1 Formulations pharmaceutiques pour administration orale et parentérale

Le développement de nouveaux médicaments implique beaucoup plus que la synthèse ou la séparation (purification) d'une substance ayant un effet donné sur l'organisme. En effet, le médicament (ou la substance active) doit être transporté à

l'endroit approprié de l'organisme et, une fois rendu, il doit être sous une forme qui est active ou disponible pour celui-ci. Ce ne sont pas des problèmes insignifiants, car le système de transport peut parfois être aussi complexe que le développement du médicament lui-même (Thrash, 1995).

Il est important que la concentration du principe actif soit maintenue à des niveaux qui donnent les bénéfices thérapeutiques maximales sans toutefois dépasser la concentration minimale pour avoir des effets toxiques ou, d'autre part, avoir une concentration en dessous de celle nécessaire pour avoir un effet sur le patient. De toutes les voies d'administrations connues pour la livraison d'un principe actif chez un patient, les trois voies les plus utilisées sont la voie orale, la voie intraveineuse et la voie transdermale (Thrash, 1995).

1.7.2 Formulations classiques, sans contrôle de la libération

Le développement des systèmes de libération a évolué à partir du système de libération classique sans contrôle (Figure 1.9) qui demande habituellement une série de plusieurs administrations. La quantité incluse dans cette forme de dosage (comprimé, capsule, etc.) est déterminante, ainsi que le taux d'absorption du principe actif. Ces deux composants influencent le taux de disponibilité du principe actif au site de livraison, et par conséquent déterminent le début de l'action pharmacologique (Greenblatt, 2006).

Le problème de cette forme de libération classique est qu'à chaque prise d'un principe actif à libération sans contrôle, la concentration du principe actif disponible atteint rapidement un sommet, mais diminue rapidement en dessous des valeurs minimales pour avoir encore un effet thérapeutique (Figure 1.9) (Thrash, 1995).

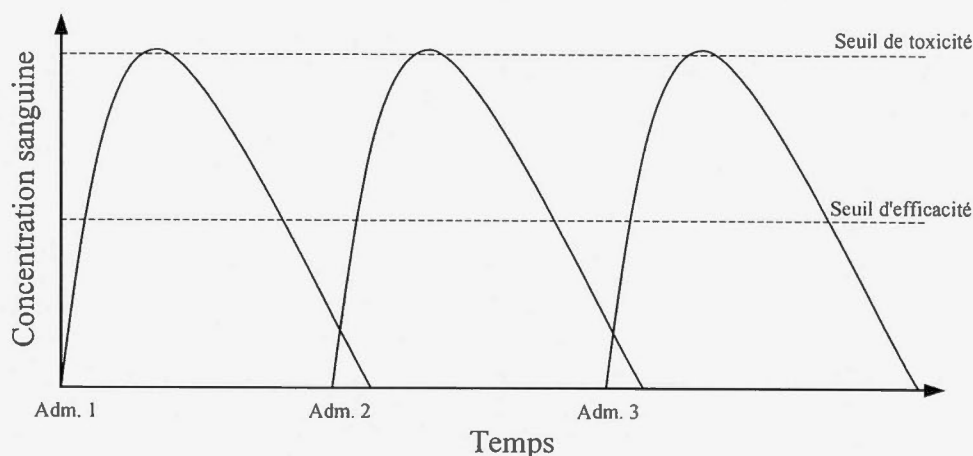


Figure 1.9: Représentation schématique de la variation de la concentration du principe actif dans le sang suite à l'administration de comprimés à formulation de type classique (administration 1, 2, 3...) sans contrôle de la libération.

1.7.3 Formulations à libération immédiate

La libération contrôlée ou retardée ou même classique, n'est pas toujours utile ou même désirable pour divers médicaments. Certaines substances actives (ex.: les antiépileptiques, les analgésiques, les anti-asthmatiques) doivent être absorbées très rapidement par l'organisme afin d'obtenir un effet immédiat. Habituellement, dans le cas où un patient a un besoin urgent et immédiat d'un médicament, le recours à la voie intraveineuse est nécessaire. Cependant, à cause des risques de contamination et des contraintes liées à cette méthode d'administration, de nouvelles avenues ont été développées pour la libération rapide d'un principe actif qui n'utilisent pas la voie intraveineuse.

Les formes pour la libération immédiate (Figure 1.10) de principes actifs administrés par voie orale, reposent sur l'utilisation d'agents désagrégeant. Peu de temps après l'ingestion du comprimé, l'agent désagrégeant (en présence d'un fluide aqueux) va déstabiliser le comprimé, résultant en une libération du principe actif. Cette libération a

la particularité d'être considérablement plus rapide que dans les formes à libération classique sans contrôle. Par exemple, l'amylose hautement réticulé a été utilisé comme un agent désagrégeant et liant efficace (Dumoulin et al., 1994; Cartilier et al., 1997).

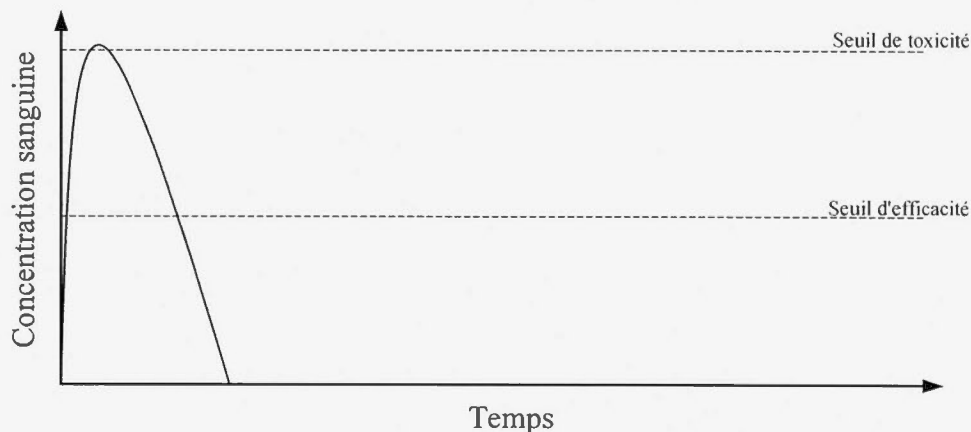


Figure 1.10: Représentation schématique de la variation de la concentration du principe actif dans le sang suite à l'administration d'un comprimé à libération immédiate.

1.7.4 Formulations à libération contrôlée

Comme son nom l'indique, la libération contrôlée (Figure 1.11) est un système qui implique un contrôle du relargage d'un ou de plusieurs principes actifs et décrit la vitesse à laquelle le ou les principes actifs sont rendus disponibles après l'ingestion du comprimé. Ce système a pour fonction de maintenir une vitesse de libération la plus constante possible sur une période de temps donnée. Cette forme de libération vient pallier les problèmes de la libération sans contrôle où, par moments, la concentration du principe actif est assez élevée pour s'approcher des concentrations toxiques, et par d'autres moments, elle est trop basse pour fournir un bénéfice thérapeutique. En ayant un système de libération qui maintient la concentration du principe actif dans les valeurs qui

donnent un effet thérapeutique, ceci diminue la fréquence des prises du médicament (Swarbrick et Boylan, 1990).

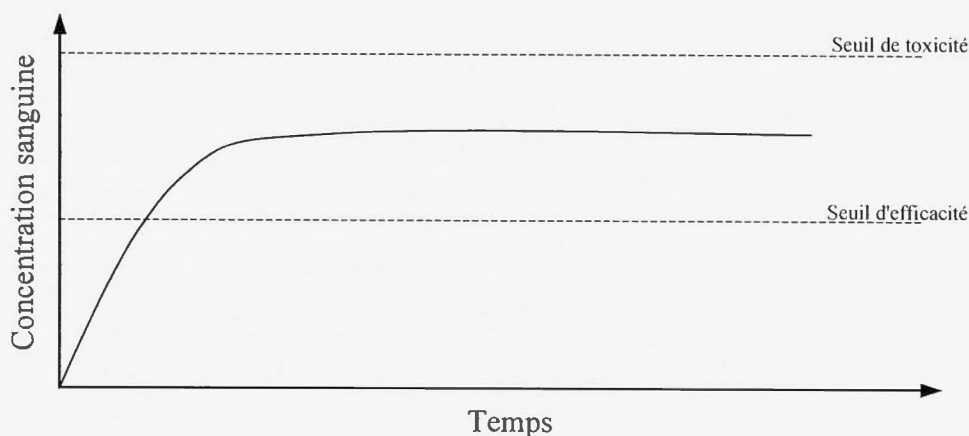


Figure 1.11: Représentation schématique de la variation de la concentration du principe actif dans le sang suite à l'administration d'un comprimé à libération contrôlée.

1.7.5 Formulations à livraison contrôlée (action retardée)

De façon générale, la livraison à action retardée est définie comme le relargage d'un ou de plusieurs principes actifs après un certain intervalle de temps suite à l'administration (Figure 1.12). Souvent, les formes à livraison contrôlée impliquent le transport du principe actif à un endroit précis de l'organisme (Thrash, 1995). L'endroit désiré pour la libération d'un principe actif dépend de la nature et du rôle thérapeutique de celui-ci. Dans le cas des formulations orales, l'intestin est souvent le lieu de prédilection où l'agent actif doit être libéré. Il existe plusieurs raisons pour avoir une libération à cet endroit: i) il est le site d'absorption de plusieurs médicaments (Langer, 1990); ii) les médicaments plus sensibles tels que ceux contenant des peptides, se dégraderaient si libérés plus tôt dans le tractus gastro-intestinal (Saffran et al., 1986) et

iii) il est le site de traitement dans le cas de maladies au niveau de l'intestin ou affectant le bon fonctionnement de celui-ci (Brown et al., 1983).

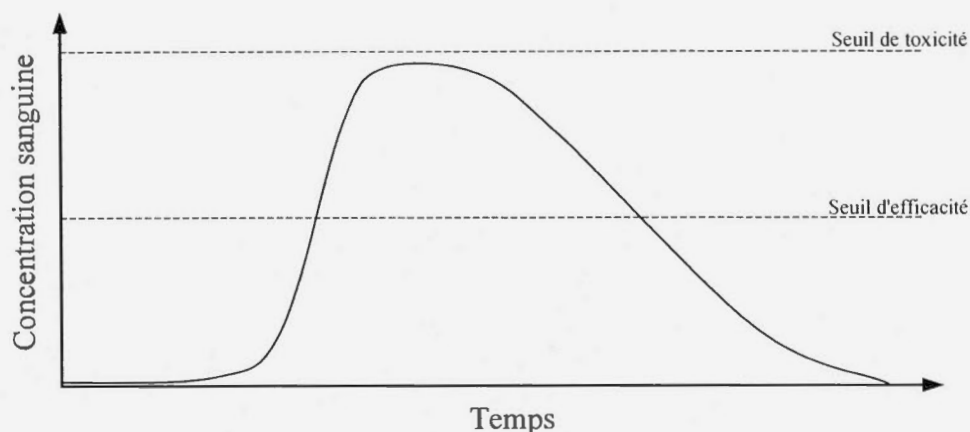


Figure 1.12: Représentation schématique de la variation de la concentration du principe actif dans le sang suite à l'administration d'un comprimé à libération retardée.

1.7.6 L'amidon et dérivés d'amidon comme excipients pharmaceutiques

1.7.6.1 Agents liants

La méthode la plus simple pour la fabrication de comprimés est la compression directe d'un mélange homogène de poudres des différents ingrédients. En plus de l'agent actif, le comprimé doit contenir un ou plusieurs composés, soit un agent de remplissage, un agent liant, un agent de désintégration, un lubrifiant, etc. Parmi les propriétés mécaniques importantes d'un comprimé se trouvent la dureté et la friabilité de celui-ci. Ces propriétés sont étroitement liées, car une augmentation de la dureté implique généralement une diminution de la friabilité. Si le comprimé est friable ou si sa dureté est insuffisante (c'est-à-dire, susceptible de se briser lors de sa manipulation ou lors du transport à son lieu de vente ou chez le patient), un agent liant est nécessaire.

Bien que plusieurs produits peuvent être compressés seuls et former une masse cohérente et compacte, la majorité des ingrédients actifs ont besoin d'un agent liant pour maintenir ensemble les particules formant le comprimé. Cet agent augmente la résistance du comprimé, décroît sa friabilité et améliore ses propriétés mécaniques. Un agent liant acceptable pour l'industrie pharmaceutique doit être facile à mélanger, être inerte et non-toxique. Par exemple, l'amylose étant constitué de chaînes non ramifiées est susceptible de s'associer entre elles par des liaisons hydrogène; ces associations peuvent générer des propriétés liantes (Dumoulin et al., 1994). Pour l'amylopectine, la présence de chaînes branchées ne permet pas les réarrangements moléculaires responsables des propriétés liantes de l'amylose. Les agents liants traditionnels couramment utilisés sont: la cellulose microcristalline (Avicel PH-101^{MC} et PH-102^{MC}), le polyvinylpyrrolidone (Kollidon^{MC}, Plasdone^{MC}), diverses formes d'amidon provenant du maïs, du blé, de la pomme de terre ainsi que les amidons modifiés. Ces produits sont habituellement utilisés à des concentrations minimales de 20 %.

1.7.6.2 Agents désagréant

Dans la fabrication de comprimés, la dureté et la friabilité sont optimisées, mais dans le cas où une libération rapide du médicament serait requise, le comprimé doit contenir des agents désagréant. Le temps de désagrégation est important quand le comprimé entre en contact avec les liquides digestifs. Le comprimé devrait être capable de se briser sans (ou presque sans) délai dans le cas où le principe actif doit être mis en circulation rapidement. Dans cette situation, un agent désagréant est ajouté dans la poudre du comprimé ce qui va promouvoir la destruction physique de celui-ci. Les agents désagréant typiques sont l'amidon de maïs, les amidons gélatinisés (Sta Rx^{MC}), les amidons modifiés comme le CM-amidon sodique (Primojel^{MC}) et l'ARA hautement réticulé (Liamid^{MC}) (Dumoulin et al., 1994).

1.7.7 Amidon riche en amylose réticulé pour la libération contrôlée de médicament

En faisant réagir l'amylose avec de l'épichlorohydrine dans une solution alcaline, il est possible d'obtenir de l'amidon réticulé (Figure 1.13). Plusieurs autres agents peuvent être utilisés pour la réticulation de l'amylose, tels que le 2,3-dibromopropanol, le sodium trimetaphosphate (STMP) et l'oxychlorure de phosphore.

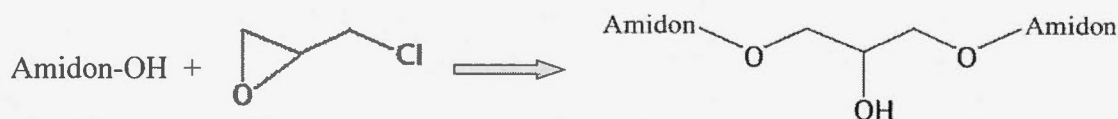


Figure 1.13: Représentation schématique de la réticulation pour la synthèse de l'amidon riche en amylose réticulé.

Bryant en 1933, a probablement été le premier à réticuler l'amidon. L'amidon riche en amylose réticulé (ARA-R), réticulé avec l'épichlorohydrine, a été utilisé initialement par Konigsberg (1950) pour retarder le gonflement des granules d'amidon. Par la suite, l'ARA-R a été suggéré comme matériel chromatographique par exclusion de taille moléculaire (Serban et al., 1975) et comme phase stationnaire dans la chromatographie d'affinité pour la séparation de l' α -amylase (Schell et al., 1981). L'activité enzymatique des exoamylases (β -amylase et glucoamylase) étant réduite en fonction du degré de réticulation de l'ARA-R (Mateescu et al., 1985), ce phénomène a permis l'utilisation de l'ARA-R comme substrat pour la détermination rapide et sélective de l' α -amylase en présence des exoamylases (Mateescu et Schell, 1983). Un test clinique où l'ARA-R formulé en comprimés (IodocromTM), permet un diagnostic rapide de la pancréatite aiguë (Valsanescu et Mateescu, 1985). Finalement, l'ARA-R a été introduit dans le milieu des années 1990 comme matrice pour la libération contrôlée d'agents bioactifs sous le nom commercial de Contramid^{MC} et a pour propriété de pouvoir contrôler la cinétique de la dissolution (Lenaerts et al., 1991; Mateescu et al., 1994). La

réticulation peut être vue comme rendant le polymère plus articulé (Mateescu et al., 1994). D'autant plus, il a été montré que la réticulation réduit le degré d'ordre (domaines cristallins) du polymère. Cependant, avec la réticulation la mobilité des différents segments est aussi réduite (Shiftan et al., 2000).

Lorsque l'ARA-R est mis sous forme de comprimé avec le principe actif, celui-ci forme un système matriciel pour la libération de médicaments. La libération est provoquée par le gonflement du comprimé (causé par la pénétration lente de l'eau dans celui-ci) ce qui induit le développement de pseudo-réticulations (ponts hydrogène); les chaînes adjacentes forment des doubles hélices entraînant la formation d'une matrice perméable continue lorsque le gonflement atteint un équilibre. L'ARA-R va typiquement gonfler sur une période de quelques jours pour atteindre une augmentation de 70-80 % au niveau de l'épaisseur et de 25-35 % au niveau du diamètre comparativement à la forme sèche (Ravenelle et al., 2002).

Lors d'une étude avec différents degrés de réticulation de l'ARA, Ispas-Szabo et al. (2000) ont montré qu'il existe un ratio optimal entre l'ordre (domaines cristallins) et le désordre (domaines amorphes) et qui est responsable de l'intégrité du comprimé lors de son gonflement dans l'eau. Ce ratio est un facteur du contrôle de la libération du principe actif. Le nombre relativement élevé des doubles hélices de l'amidon retrouvé en nature implique une faible résistance mécanique des comprimés lors de tests de dissolution. Les matrices non réticulées ou possédant un degré de réticulation faible (synthétisées avec 3 g ou moins d'épichlorohydrine / 100 g ARA) avec des structures cristallines dominantes par rapport aux zones amorphes ne permettant pas le gonflement du comprimé, génèrent la désagrégation. Pour les ARA-R modérément réticulés (synthétisés avec 6 à 8 g d'épichlorohydrine / 100 g ARA), les parties amorphes sont plus étendues et les chaînes ont plus de flexibilité. Une fois sous forme de comprimé, cette structure est favorable pour la formation d'un réseau stable lors du gonflement (Ispas-Szabo et al., 2000).

1.7.8 Système de libération contrôlée enzymatiquement

Avec l'utilisation d'une matrice susceptible à la dégradation enzymatique, il est possible d'avoir un contrôle supplémentaire sur la libération du principe actif. Par exemple, l'amidon réticulé avec le chlorure de calcium a été utilisé dans les formulations de grosses molécules pour leurs administrations par voie orale. Le taux de dégradation de la matrice (ayant pour conséquence la libération du principe actif) est dépendant de l'activité enzymatique de l' α -amylase au niveau du petit intestin (érosion enzymatique externe) (Kost et Shefer, 1990). Un autre système de libération contrôlé enzymatiquement utilisant l'ARA-R (réticulation avec l'épichlorohydrine) a été proposé par Dumoulin et al. en 1999. Ce système peut procurer à certains médicaments une gamme de temps de libération (au choix) qui peut être modulée en fonction de l'activité enzymatique de l' α -amylase incluse dans la matrice (érosion enzymatique interne). L'hydrolyse enzymatique interne du comprimé est initiée et conditionnée par la pénétration de l'eau et par d'autres mécanismes tels que le gonflement, la diffusion et l'érosion du polymère (Dumoulin et al., 1998).

Une autre modalité de contrôle enzymatique est la libération pulsative d'agents bioactifs modulée par l'utilisation d'une capsule imperméable ayant une ouverture obstruée par un bouchon contenant un mélange de pectine et de pectinase. La libération du principe actif est contrôlée par le ratio pectine:enzyme, le pH du milieu et par l'addition d'agents ayant des propriétés tampons ou chélatrices (Krogel et Bodmeier, 1999).

1.7.9 L'amidon riche en amylose hautement réticulé – agent liant et désagrégeant

Lorsque le degré de réticulation de ARA-R est élevé (synthétisé avec 20 g d'épichlorohydrine / 100 g ARA), la densité élevée de réticulations transversales entre

les chaînes du polysaccharide empêche la flexibilité des chaînes et leur stabilisation par associations hydrogène. Ceci donne une structure presque complètement désordonnée et nuit à la formation d'une conformation favorable lors du gonflement du comprimé en présence d'eau (Ispas-Szabo et al., 2000). D'autre part, les groupements hydroxyles des chaînes ne sont plus disponibles dans le réseau pour fournir une stabilisation de la matrice par des liaisons hydrogène. Cependant, ces groupements hydroxyles sont accessibles pour l'hydratation rapide du comprimé, favorisant ainsi la désagrégation (Kim et Lee, 1992; Moussa et Cartilier, 1996).

L'amylose réticulé utilisé comme agent désagrégeant et dans une proportion de 20 % de la masse du comprimé (le reste de la masse pouvant être composé de plusieurs autres produits, tels qu'un agent actif, un agent de remplissage ou un lubrifiant) montre des temps de désagrégation entre 30 et 90 secondes (dans l'eau à 37 °C) pour des forces de compression entre 2 et 8 T. Des mélanges variés avec différents ratios d'ARA-R à de différents degrés de réticulation, ont été étudiés en montrant des temps de désagrégation entre 30 et 90 secondes. Différemment des autres excipients agissants les uns comme agent liant et les autres comme agent désagrégeant, l'ARA-R possède en même temps des propriétés désagrégeantes et des propriétés liantes (plus grande résistance à la friabilité et plus grande dureté des comprimés) lorsqu'il est utilisé selon Dumoulin et al. (1994). Les propriétés liantes de l'ARA-R sont nettement supérieures à celles de l'amylopectine réticulée ce qui est dû à la nature non branchée de l'amylose ce qui rend celui-ci susceptible à une stabilisation par des liens hydrogène.

1.7.10 Dérivés de l'amidon riche en amylose réticulé comme matrices à libération contrôlée

Puisque les groupements hydroxyles jouent un rôle important dans l'organisation du réseau de la matrice, l'ajout de groupements ioniques (aminoalkyle et

carboxyméthyle) peut générer de nouvelles liaisons hydrogène sur l'ARA-R. D'autre part, l'ajout de groupement moins polaire (acétate) peut contribuer aux interactions hydrophobes à l'intérieur de la matrice, minimisant ainsi l'accès à l'eau (Mulhbacher et al., 2001).

Les dérivés carboxyméthyle, aminoéthyle et acétate de l'amidon riche en amylose réticulé permettent de contrôler la libération de médicaments sur des périodes de temps supérieures à 20 heures avec des comprimés contenant des charges élevées d'éléments actifs, allant de 20 à 60 % (Mulhbacher et al., 2001; Mateescu et al., 2006). Le degré de substitution des dérivés de l'ARA-R peut être modulé en modifiant les rapports des réactifs dans la synthèse.

1.7.11 Le carboxyméthylamidon comme excipient pharmaceutique

Le carboxyméthylamidon de forme sodique (Primojel^{MC}) est le sel de sodium du carboxyméthyléther de l'amidon (la carboxyméthylation ayant pour but d'augmenter son hydrophilicité). Il est aussi possible de réticuler le CM-amidon afin de réduire la solubilité de l'excipient (Shah et Augsburg, 2002). Cet excipient est aussi couramment appelé "*glycolate d'amidon sodique*" mais cette appellation est erronée en raison du fait que le CM-amidon est un éther de l'amidon. Sa masse moléculaire est typiquement de 500 000 à 11 000 000. C'est une poudre blanche fine, sans odeur (ou presque) qui est pratiquement insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques.

Le CM-amidon sodique est largement utilisé dans le milieu pharmaceutique pour les formulations orales. Son rôle est d'être un agent désagrégeant dans les comprimés ou capsules où sa concentration recommandée est de 2-8 %, avec une concentration optimale de 4 %. L'absorption massive de l'eau (hydratation) cause un gonflement considérable et la désagréation rapide du comprimé. L'efficacité du CM-amidon

sodique n'est pas diminuée par la présence d'excipients hydrophobes, tels que les lubrifiants ou des actifs moins polaires.

CHAPITRE II

LE PANCRÉAS (CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES)

2.1 Le pancréas – Fonctions endocrines et exocrines

Le pancréas est un organe allongé, situé au niveau de la première et de la seconde vertèbre lombaire et qui est connecté au duodénum. Il sécrète un liquide alcalin transparent et sans odeur, d'une faible viscosité avec une haute teneur en bicarbonate (Brobeck, 1979). Cette particularité contraste avec le fluide gastrique qui est sécrété dans l'estomac. Le fait que l'estomac sécrète de l'acide et que le pancréas sécrète une base est un facteur pour le maintien de l'équilibre acide-base de l'organisme et permet d'avoir un pH neutre au niveau de l'intestin (Best et Taylor, 1961).

Les principaux composants du fluide pancréatique sont le sodium, le potassium et le calcium (sous formes ioniques). Les concentrations en sodium et en potassium sont approximativement équivalentes à celles du plasma sanguin, mais la concentration en calcium est seulement de 2 à 4 % comparativement à environ 10 % pour le sang (Wu et al., 1983). La faible teneur en calcium comparée à celle du sang est attribuable au fait qu'une grande quantité de calcium sanguin est combinée avec des protéines et est donc sous une forme qui ne peut pas diffuser facilement (Best et Taylor, 1961).

La concentration en protéines retrouvée dans le fluide pancréatique chez l'humain est de 0,1 à 0,3 % (Brobeck, 1979). Ces protéines sont principalement des enzymes et elles sont capables de digérer les trois types majeurs de nourriture (les

carbohydrates, les gras et les protéines). En d'autres termes, le fluide pancréatique contient des enzymes de type amylolytique (α -amylase), lipolytique (lipase) et protéolytique (trypsine, chymotrypsine) (Best et Taylor, 1961).

Il est connu que suite à l'ablation du pancréas ou lorsque le fluide pancréatique est détourné et n'atteint pas l'intestin, des problèmes digestifs se manifestent. Des complications plus sérieuses apparaissent en quelques jours: les sécrétions pancréatiques (lorsque le fluide pancréatique est détourné) deviennent continues, leurs volumes augmentent et leurs compositions changent. L'animal perd rapidement du poids, refuse de se nourrir et meurt dans un laps de temps de 5-8 jours. Une perte substantielle d'ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} provoque des changements dans le sang qui ultimement s'avèrent être fatales (Best et Taylor, 1961).

2.2 Les enzymes pancréatiques

Les enzymes constituent un groupe essentiel de protéines qui agissent comme catalyseurs biologiques et accroissent la vitesse des réactions par un facteur pouvant aller jusqu'à 10^{12} sans altérer la position d'équilibre de ces réactions et sans subir eux-mêmes des changements permanents (Price et Stevens, 1984). Les trois propriétés fondamentales des enzymes sont: i) leurs pouvoirs catalytiques, ii) leurs spécificités et iii) leurs habiletés à être régulées (Price et Stevens, 1984). Les enzymes sont très spécifiques et chaque enzyme catalyse habituellement, mais pas exclusivement, un seul type de réaction (spécificité d'action). Dans une cellule typique, il y a environ 4000 enzymes différentes (Vander et al., 1995 (a)).

Une enzyme forme un complexe réactif avec un ou plusieurs de ses substrats et diminue l'énergie d'activation par rapport à la réaction non catalysée. Les formes tertiaires et quaternaires des enzymes sont essentielles pour permettre leurs activités. Il y

a une région spécifique de ces protéines où le substrat se lie et où la réaction a lieu. Certains agents chimiques tels que les bases fortes, les acides forts, les températures extrêmes ou les concentrations élevées en sels, causent des changements au niveau de la structure tertiaire et dénaturent, habituellement de façon irréversible, l'enzyme et son pouvoir catalytique (Price et Stevens, 1984).

Le canal pancréatique se joint au canal cholédoque (*ductus choledochus*) avant de pénétrer dans le duodénum. Des cellules pancréatiques à l'extrémité pancréatique du système de canaux sécrètent les enzymes, alors que des cellules épithéliales tapissant les premières portions de ces mêmes canaux, sécrètent les ions bicarbonates (Vander et al., 1995 (b)). Après leurs activations, les enzymes sécrétées par le pancréas digèrent les polysaccharides, les lipides, les protéines et les acides nucléiques en libérant respectivement des oligosaccharides, des acides gras, des acides aminés et des nucléotides (Vander et al. 1995 (b)), voir tableau 2.1.

L'importance des enzymes pancréatiques dans la digestion a été montrée par l'enlèvement du fluide pancréatique (par pancréatectomie expérimentale chez l'animal). La digestion et l'absorption en sont sérieusement affectées. Ces problèmes sont plus prononcés dans le cas des gras et des protéines (Best et Taylor, 1961). Les fécès montrent de grandes quantités de gras non absorbés: une condition appelée stéatorrhée.

Tableau 2.1: Action de certaines enzymes sécrétées par le système digestif des mammifères (*selon Eckert et al., 1999*).

| Enzyme | Lieu d'action | Substrat | Produit obtenu |
|-------------------------------------|------------------|-------------------|---------------------------------------|
| Glandes salivaires | | | |
| α -amylase salivaire | Cavité orale | Amidon | Quelques disaccharides, dextrines |
| Estomac | | | |
| Pepsinogène \rightarrow pepsine | Estomac | Protéines | Longs peptides |
| Lipase gastrique | Estomac | Triglycérides | Monoglycérides, acides gras, glycérol |
| Pancréas | | | |
| α -amylase pancréatique | Intestin grêle | Amidon, dextrines | Disaccharides |
| Trypsinogène \rightarrow trypsine | Intestin grêle | Protéines | Longs peptides |
| Chymotrypsine | Intestin grêle | Protéines | Longs peptides |
| Élastase | Intestin grêle | Élastine | Longs peptides |
| Carboxypeptidases | Intestin grêle | Longs peptides | Oligopeptides, acide aminés |
| Aminopeptidases | Intestin grêle | Longs peptides | Oligopeptides, acide aminés |
| Lipase | Intestin grêle | Triglycérides | Monoglycérides, acides gras, glycérol |
| Nucléases | Intestin grêle | Acides nucléiques | Nucléotides |
| Intestin grêle | | | |
| Entérokinase | Intestin grêle | Trypsinogène | Trypsine |
| Disaccharidase | Intestin grêle * | Disaccharides | Monosaccharides |
| Peptidases | Intestin grêle * | Oligopeptides | Acides aminés |
| Nucléotidases | Intestin grêle * | Nucléotides | Nucléosides, acide phosphorique |
| Nucléosidases | Intestin grêle * | Nucléosides | Sucres, purines, pyrimidines |

* Intracellulaire

2.2.1 L' α -amylase

L' α -amylase est une enzyme digestive sécrétée sous deux formes (isoenzymes) par le pancréas et par la glande parotide, respectivement. L'activité amylolytique du fluide pancréatique est causée par l'amylase pancréatique (Figure 2.1). Il y a plusieurs enzymes impliquées dans la digestion des carbohydrates [exemples: lactase, maltase, sucrase, etc. (produites par les cellules de l'intestin grêle, voir tableau 2.1)]. L'amylase est sécrétée sous forme active. Elle peut devenir inactive si elle est dialysée dans de l'eau distillée, ce qui montre que certains ions sont essentiels à son activité. L'ion qui s'est montré le plus efficace pour activer l'enzyme est le Cl^- et le pH optimal pour l'amylase varie entre 6,5 et 7,2 en fonction de la quantité d'ions présents dans la solution saline neutre (Best et Taylor, 1961). Cette enzyme digère l'amidon ainsi que le glycogène et, dans les conditions favorables, le produit de digestion formé est le maltose.

Chez l'humain, cette enzyme est codée par une famille de gènes située sur le chromosome 1. La régulation de ces gènes fait que différentes enzymes sont sécrétées selon que l' α -amylase est produite par les glandes salivaires ou par le pancréas. Bien que les deux isoenzymes aient autour de 97 % d'homologie, elles sont issues de différents tissus et n'ont pas le même schéma de clivage de l'amidon (Minamiura, 1988). L' α -amylase humaine possède une masse moléculaire approximativement de 45 000 (Brobeck, 1979).

La structure de l' α -amylase pancréatique humaine a été déterminée par des techniques de diffraction des rayons X à une résolution de 0,18 nm (Brayer et al., 1995). Elle est composée de trois domaines structuraux. Le domaine A qui est le plus grand (résidus 1-99, 169-404), est composé d'une structure en puits formée de huit feuillets β parallèles entrelacés, ayant à un bout le site actif composé des résidus Asp-197, Glu-233 et Asp-300. Près du site actif se trouve un ion chlorure formant des interactions avec Arg-195, Asn-298 et Arg-337. Cet ion assisterait la réaction en étant un activateur

allostérique de la catalyse (Brayer et al., 1995). Le domaine B est le plus petit (résidus 100-168) et sert comme site de liaison pour l'ion calcium (Asn-100, Arg-158, Asp-167 et His-201). Le domaine C (résidus 405-496) est composé de feuillets β antiparallèles et il est faiblement associé aux domaines A et B. Un fait notable est que le résidu glutamine N-terminale subi une modification post-traductionnelle pour former un dérivé pyrrolidone stable qui pourrait fournir une protection de l' α -amylase contre l'action des aminopeptidases et autres enzymes digestives (Brayer et al., 1995).

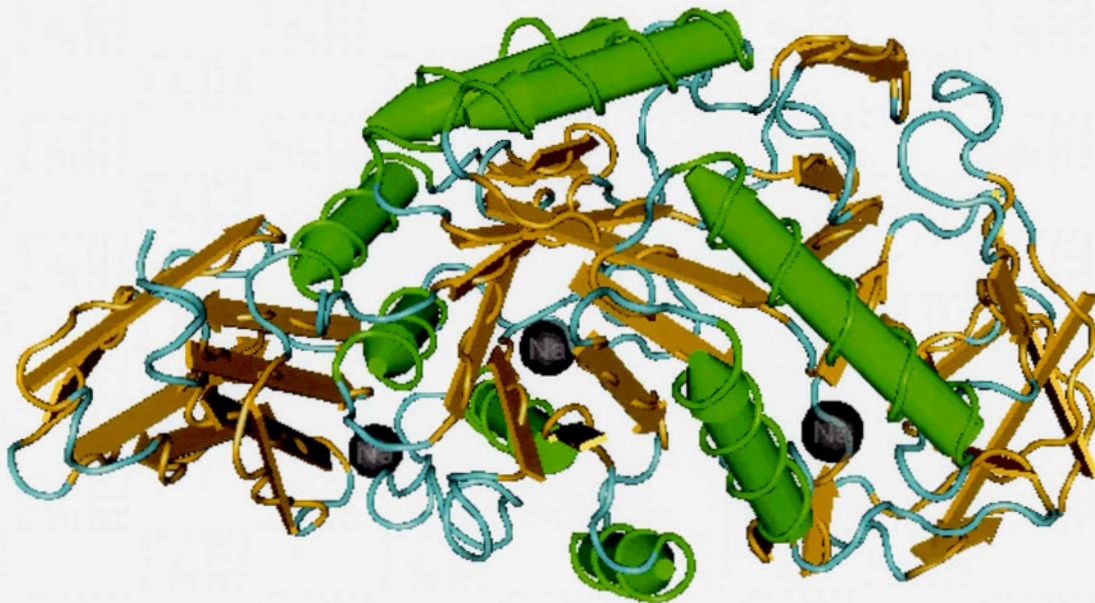


Figure 2.1: Représentation tridimensionnelle de l' α -amylase (sans ion calcium) provenant de *Bacillus* sp. (EC 3.2.1.1, d'après Chen et al., 2003).

En laboratoire, plusieurs substrats peuvent être utilisés pour déterminer l'activité enzymatique de l' α -amylase. L'amidon soluble peut être incubé en présence de l'enzyme et le produit de la réaction révélé à 535 nm après une incubation dans une solution d'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) (Noelting and Bernfeld, 1948). Une faiblesse de

cette méthode est que la réaction avec le DNS requiert un chauffage à 100 °C; cette méthode nécessite aussi un temps d'incubation précis et l'utilisation de plusieurs dilutions enzymatiques si l'activité de l'enzyme n'est pas connue. Un dosage plus récent est basé sur la vitesse de l'hydrolyse du 2-chloro-4-nitrophenyl- α -D-maltotrioside qui peut être directement observée par l'augmentation de l'absorbance à 400 nm telle qu'utilisé selon Gella et al. (1997).

2.2.2 La lipase

La capacité du fluide pancréatique à émulsifier et à hydrolyser les gras est vraisemblablement due à une seule enzyme appelée lipase pancréatique (EC 3.1.1.3) (Figure 2.2) (Egloff et al., 1995). Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des esters de glycérol possédant de longues chaînes d'acides gras (les groupes esters primaires des triglycérides sont le plus facilement attaqués tandis que les monoglycérides sont de moins bons substrats). En effet, le substrat n'est pas une seule et unique molécule mais une phase non aqueuse de lipides agglomérés (Brokerhoff et Jensen, 1974).

L'enzyme pour être active nécessite la présence de Ca^{2+} (les ions Sr^{2+} et Mg^{2+} sont aussi des activateurs mais moins efficaces) ainsi que la présence de sels biliaires ou d'autres substances (exemple: certains détergents) ayant des propriétés similaires (Sarda et al., 1957). Les sels biliaires à de faibles concentrations (jusqu'à 0,3 mM) augmentent la stabilité de la lipase par un facteur cinq. En forte concentration (0,3-0,8 mM) mais en dessous de la concentration micellaire critique, ceux-ci interfèrent avec l'absorption de l'enzyme à la surface du substrat ce qui inhibe l'action de l'enzyme (Borgström et Erlanson, 1973). Certains sels de métaux lourds inhibent aussi l'action de l'enzyme. Le pH auquel la lipase montre son activité optimale varie dépendamment du substrat utilisé mais demeure toujours dans le domaine légèrement alcalin (Best et Taylor, 1961).

La lipase pancréatique porcine se présente sous deux formes: la lipase A et B. La lipase A est plus acide que la lipase B, mais à part cette différence, les deux enzymes sont pratiquement identiques (Verger et al., 1969). Leurs poids moléculaires se situent entre 45 000 et 50 000 et leurs points isoélectriques sont de 4,9 et de 5,0 pour la lipase A et B respectivement (Brockerhoff et Jensen, 1974). Une histidine est impliquée au niveau du site actif. La composition en acides aminés de l'enzyme peut être trouvée dans Brockerhoff et Jensen (1974), table IV-3, page 43.



Figure 2.2: Représentation tridimensionnelle de la lipase (EC 3.1.1.3, d'après Chen et al., 2003).

En laboratoire, il existe plusieurs substrats utilisés pour la détermination de l'activité enzymatique de la lipase. Beisson et al. (2000) ont classifié ces méthodes en neuf catégories: la titration, la spectroscopie (photométrie, fluorimétrie, infrarouge), la chromatographie, la radioactivité, la tensiométrie interfaciale, la turbidimétrie, la conductimétrie, l'immunochimie et la microscopie. Un substrat historiquement bien connu et encore utilisé aujourd'hui pour déterminer l'activité enzymatique de la lipase, est une émulsion d'huile d'olive (méthode titrimétrique de Cherry et Crandall, 1932). Cependant, les méthodes colorimétriques sont plus intéressantes à cause de la grande disponibilité des spectrophotomètres dans les laboratoires ainsi qu'à cause de la remarquable précision de ces appareils. Un substrat chromogénique tel que le nitrophénylester ayant des chaînes alkyles de longueurs variées, peut être utilisé dans une microémulsion eau/huile dont la taille des micelles est modulée par le bis-2-éthylhexylsulfosuccinate (Fletcher et al., 1985). La vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration en enzymes (lorsque le substrat est en excès). Cependant, cette méthode n'est pas appropriée pour les solutions enzymatiques contenant des détergents couramment utilisés pour l'extraction des protéines hydrophobes puisqu'ils déstabilisent la microémulsion. Une variante de la méthode de Fletcher et al. (1985) et compatible avec les détergents, utilise le 4-nitrophenyl butyrate dissous dans le *n*-heptane à une concentration de 0,15 M (Zhong et Glatz, 2006). La vitesse de réaction de l'activité enzymatique est observable par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 346 nm.

2.2.3 La trypsine

La trypsine (Figure 2.3) accélère la dégradation des protéines lors de la digestion. Les acides aminés libérés et les produits de la dégradation des protéines et des peptides résultants [par des peptidases situées principalement dans la muqueuse intestinale et par une carboxypeptidase contenue dans le fluide pancréatique (Best et Taylor, 1961)]

peuvent servir à créer de nouvelles protéines ou à fournir de l'énergie. Comme la trypsine pourrait hydrolyser les membranes des cellules où cette enzyme est produite ainsi que les tissus adjacents, elle est synthétisée dans le pancréas sous une forme inactive (zymogène). Le trypsinogène est une simple chaîne de 229 acides aminés possédant une masse moléculaire approximative de 25 000 (Brobeck, 1979). L'entérokinase, une enzyme protéolytique se trouvant au niveau de la membrane plasmique apicale de l'épithélium intestinal, scinde un peptide du trypsinogène, formant ainsi l'enzyme active: la trypsine. Dans son action sur les protéines, la trypsine hydrolyse seulement les liens peptidiques des acides aminés dont le groupement -CO est lié à la fonction amino d'un acide aminé possédant une charge positive tels que les arginines et les lysines (Brobeck, 1979). La trypsine est aussi reconnue comme étant une enzyme protéolytique qui active d'autres zymogènes pancréatiques en scindant des fragments peptidiques (Vander et al., 1995 (b)).

Le pH optimal pour la digestion de la caséine par la trypsine, se situe entre 8 et 9 (Brobeck, 1979). Quand l'enzyme est pure, elle est inactivée réversiblement par la chaleur lorsqu'elle est dans un milieu acide, mais se décompose lentement dans un milieu alcalin (Best et Taylor, 1961). Il est à noter que plusieurs enzymes pancréatiques, comme l'amylase et la lipase, sont sécrétées sous des formes actives, mais nécessitent la présence de facteurs additionnels, comme des ions ou des sels biliaires présents dans la lumière intestinale, pour atteindre leur activité maximale (Vander et al., 1995 (b)).

La trypsine est une sérine protéinase ayant un site catalytique consistant de trois acides aminés (Ser-195, His-57 et Asp-102) (Beveridge, 1996). Dans l'enzyme native, l'anneau imidazole de His-57 est neutre et le groupement hydroxyle de Ser-195 fonctionne comme attaquant nucléophile durant les premières phases de la catalyse (Beveridge, 1996). Dans la réaction enzymatique, l'His-57 fonctionne comme une base qui augmente la réactivité de Ser-195 tandis que Asp-102 joue deux rôles importants. Le premier est de stabiliser l'His-57 protonné (l'intermédiaire ionique formé durant

l'acylation) et le second est de fixer la configuration autour du site actif pour promouvoir le processus catalytique (Ishida et Kato, 2004). L'occurrence ubiquitaire des triades catalytiques dans plusieurs enzymes hydrolytiques prouve la versatilité et l'efficacité de ce motif structural dans la catalyse.

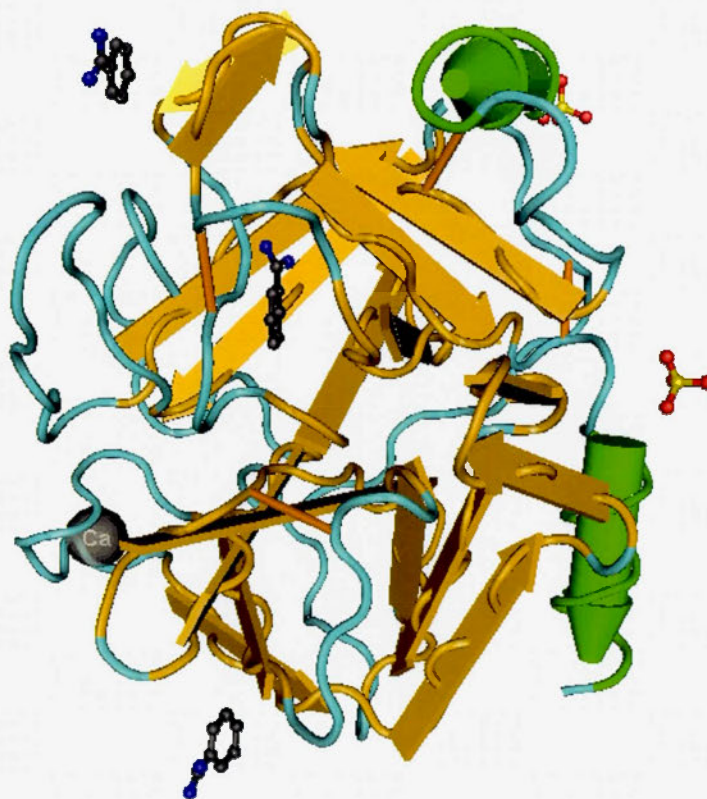


Figure 2.3: Représentation tridimensionnelle de la trypsine pancréatique de rat (EC 3.4.21.4, d'après *Chen et al.*, 2003).

En laboratoire, une solution contenant du N α -benzoyl-L-arginine éthyl ester (BAEE) est couramment utilisée pour déterminer la vitesse de réaction de la trypsine (Bergmeyer et al., 1974). Cette méthode est basée sur la fonction estérase de la trypsine et les produits de la réaction sont quantifiables à 253 nm à l'aide d'un spectrophotomètre,

ce qui permet d'observer directement la progression de la réaction enzymatique. Une autre méthode utilisant la fonction protéase de cette enzyme, fait appel à la caséine couplée au résorufin [acide N-(résorufin-4-carbonyl)piperidine-4-carbonique N-hydroxysuccinimide ester]. Ce substrat est bien adapté pour la détection de l'activité protéolytique et les produits relargués (peptides liés au résorufin) peuvent être mesurés autant par des méthodes spectroscopiques (574 nm) que par des méthodes fluorimétriques (584 nm) (Schickaneder et al., 1988).

2.3 Les affections pancréatiques et les enzymes de remplacement

Une absorption adéquate des nutriments requiert une activité enzymatique suffisante dans la lumière du duodénum simultanément avec les nutriments de la nourriture. Par conséquent, une insuffisance sévère de la production exocrine par le pancréas entraîne une mauvaise absorption des nutriments, ce qui est souvent le cas dans la phase avancée de la pancréatite chronique. En contraste avec les autres enzymes clés, la synthèse et la sécrétion de lipase sont affectées plus rapidement. Sa survie dans la lumière intestinale est plus courte à cause de sa sensibilité plus grande à l'acidité et à la dénaturation protéolytique (Layer et Keller, 1999). En effet, le fluide gastrique contient de la pepsine et les sécrétions provenant du petit intestin, fournissent des enzymes protéolytiques. D'autant plus que l'amylase produite par les glandes salivaires et les nombreuses disaccharidases produites par le petit intestin aident à la digestion des carbohydrates même lorsqu'il y a une insuffisance sévère des sécrétions pancréatiques (Brobeck, 1979).

Un test clinique couramment utilisé pour la détection de l'insuffisance des sécrétions exocrines du pancréas est une mesure quantitative des gras dans les matières fécales. Un individu normal ayant une diète standard n'excrète habituellement pas plus de 6-7 g de gras dans les fécès sur une période de 24 h. Les patients atteints

d'insuffisances pancréatiques, peuvent excréter jusqu'à 50 g de gras en 24 h, dépendamment de la quantité de gras présent dans leurs alimentations et de la sévérité de l'insuffisance pancréatique (Brobeck, 1979). Lors de ce test, l'alimentation du patient doit comporter une quantité adéquate de gras (approximativement 100 g). Une autre méthode de dépistage implique l'injection de sécrétine (et/ou de pancréozymine) et se fait par des prélèvements d'échantillons du fluide gastrique, de sécrétions du duodénum et du pancréas. Le volume des sécrétions, le pH, la teneur en bicarbonate et l'activité enzymatique sont déterminés à partir des échantillons du fluide provenant du duodénum. Chez les patients ayant une obstruction des canaux pancréatiques ou lorsqu'il y a des dommages au pancréas (exemple: pancréatite ou fibrose kystique), le débit des sécrétions est affecté. Dans le cas des maladies inflammatoires du pancréas, la concentration en bicarbonate est remarquablement diminuée (Brobeck, 1979).

Lorsqu'il y a un diagnostic montrant des problèmes au niveau de la digestion des gras, il est possible de faire appel à des enzymes de remplacement qui seront administrées au patient pour combler le manque. Les recommandations pour les enzymes de remplacement sont basées sur les concepts thérapeutiques actuels: 25 000 à 40 000 unités de lipase par repas (Layer et al., 2001). Pour l'administration, des comprimés entériques composés de microsphères sont utilisés pour transporter les enzymes de remplacement (pancréatine). Des études ont été faites afin de permettre un relargage des enzymes de remplacement au site intestinal en optimisant la taille individuelle des microsphères et en optimisant les propriétés chimiques de l'enrobage. Cependant, la digestion des lipides ne peut être complètement normalisée chez la plupart des patients en utilisant les thérapies standards (Layer et Keller, 1999).

2.3.1 La pancréatite aiguë

La pancréatite aiguë est une affection qui apparaît brusquement et se poursuit sur une courte période de temps. Certaines personnes ont plus d'une attaque mais récupèrent après chacune d'elle. Cependant, la pancréatite aiguë sévère peut avoir de nombreuses complications et peut être une maladie mortelle. Environ 80 000 cas surviennent chaque année aux États-Unis seulement et environ 20 % des cas sont considérés comme sévères. Cette maladie touche plus souvent les hommes que les femmes. La pancréatite aiguë est souvent causée par la formation de calculs biliaires dans le canal pancréatique ou par l'abus d'alcool (Whitcomb, 2004).

La pancréatite aiguë s'identifie par des douleurs dans le haut de l'abdomen, qui persistent pendant quelques jours. La douleur peut apparaître soudainement ou être faible et augmenter en intensité lorsque de la nourriture est consommée. Les autres symptômes peuvent inclure des nausées, des vomissements, de la fièvre et un pouls rapide. Dans les cas sévères, il peut y avoir déshydratation et une faible pression sanguine (Whitcomb, 2004).

2.3.2 La pancréatite chronique

Si des dommages au pancréas s'effectuent sur une longue période, la pancréatite aiguë peut faire place à un stade plus avancé: la pancréatite chronique. Cependant, la pancréatite chronique peut être déclenchée par une seule attaque de pancréatite aiguë, surtout si les canaux pancréatiques sont endommagés. Cette maladie se produit lorsque les enzymes digestives attaquent et détruisent le pancréas et les tissus adjacents causant la formation de tissu de cicatrisation, tout en provoquant de la douleur. La cause la plus commune de la pancréatite chronique (70 % des cas) est l'abus d'alcool sur une période de plusieurs années. D'autres facteurs sont le blocage des canaux pancréatiques causé par

un trauma, par la formation de pseudocystes, par la fibrose kystique, par l'hypercalcémie, par de hauts niveaux sanguins en gras ou par la consommation de drogues, ainsi qu'à cause de certaines maladies auto-immunes, l'hérédité ou autres causes idiopathiques (Whitcomb, 2004).

La pancréatite chronique se traduit habituellement par des douleurs abdominales (bien que certains sujets peuvent ressentir aucune douleur) qui peuvent, comme dans le cas de pancréatites aiguës, augmenter en intensité lorsque l'individu consomme de la nourriture. Dans certains cas, la douleur peut s'atténuer avec le temps, probablement à cause que le pancréas ne produit plus les enzymes digestives à un niveau normal. De plus, le sujet perd souvent du poids, même si sa consommation en nourriture reste normale. Ceci est dû au fait que le pancréas ne sécrète pas assez d'enzymes pour digérer la nourriture ce qui fait en sorte que les nutriments ne sont pas absorbés normalement. La malabsorption cause aussi l'excrétion de gras, de protéines et de sucres dans les selles. Si les cellules productrices d'insuline du pancréas ont également été endommagées, le diabète peut aussi se développer (Whitcomb, 2004).

2.3.3 Formes commerciales d'enzymes de remplacement

Les enzymes de remplacements réduisent l'ampleur de la stéatorrhée, de la douleur ainsi qu'une variété de symptômes chez les patients souffrants de pancréatite (Czako et al., 2003). Cependant, une compensation complète par des enzymes de remplacements de l'insuffisance enzymatique ne peut pas être atteinte chez tous les patients (Trifan et al., 2001).

Les types et les doses recommandés pour les enzymes de remplacement doivent être adaptés selon le patient. Il y a donc plusieurs formes commerciales d'enzymes pancréatiques disponibles sur le marché. Par exemple, la Pancrease^{MC} (Pancrelipase) de

McNeil Pharmaceutical, remplace les trois enzymes qui ne sont plus produites par le pancréas. La Pancrease^{MC} de type *HL (High Lipase)* contient 22 500 unités d'amylase, 22 500 unités de lipase et 1250 unités de protéase tandis que le type *MT 16* avec un enrobage entérique, contient 48 000 unités d'amylase, 16 000 unités de lipase et 48 000 unités de protéase. D'autres formes sont disponibles tel que le Creon^{MC} de Solvay. Cette formulation d'enzymes de remplacement est l'une des plus prescrite à travers le monde et contient 10 000, 25 000 ou 40 000 unités de lipase. Le Nutrizym^{MC} de Merck est présentement disponible en deux versions, le Nutrizym^{MC} 10 qui contient 155 mg de pancréatine (9000 unités d'amylase, 10 000 unités de lipase et 500 unités de protéase) et le Nutrizym^{MC} 22 qui contient 340 mg de pancréatine par capsule (19 800 unités d'amylase, 22 000 unités de lipase et 1100 unités de protéase). D'autres compagnies pharmaceutiques offrent aussi des formulations contenant de tels enzymes.

CHAPITRE III

PRÉSENTATION DU PROJET

Le contexte:

Le laboratoire d'enzymologie et des polymères biocompatibles a réalisé depuis les années '90 plusieurs matériaux pour des formulations pharmaceutiques. Ainsi l'amidon riche en amylose à faibles réticulations (ARA-R) (Lenaerts et al., 1991; Mateescu et al., 1994; Ispas-Szabo et al., 2000) a été proposé comme matrice pour la libération contrôlée de médicaments et est en production sous le nom commercial de Contramid^{MC} par la société Labopharm inc., tandis que l'ARA-R à réticulation élevée (Liamid^{MC}) permet la libération immédiate (Cartilier et al., 1997; Dumoulin et al., 1994). Le Contramid^{MC} permet des charges de médicament allant de 10-30 % dans les comprimés. Mulhbacher et al. ont réalisé divers dérivés de l'ARA-R, dont le CM-ARA-R, permettant des charges élevées, jusqu'à 60 % actif dans le comprimé.

Récemment, le laboratoire a proposé des dérivés carboxyliques de l'ARA sans réticulation (Mulhbacher et al., 2004; Calinescu et al., 2005) assurant la stabilité gastrique des actifs et leur libération à temps désirés (modulable par le degré de substitution de l'ARA). Le principe de la gastro-protection repose sur la protonation des fonctions carboxyles en milieu gastrique, assurant une structure compacte et résistante des comprimés. En milieu intestinal, les comprimés sont déprotonés et les formes sodiques deviennent gonflables et solubles en libérant ainsi le principe actif.

Le projet:

Le présent projet représente un élargissement des approches précédentes (Mulhbachet et al., 2004) en ajoutant au CM-ARA une autre matrice carboxylique (le succinate ARA) et allant vers d'autres actifs d'intérêt pharmaceutique majeur pour le traitement des pancréatites aiguës et chroniques: les enzymes pancréatiques.

L'objectif principal de ce projet était d'obtenir un amidon riche en amylose carboxyméthylé (CM-ARA) et un succinate amidon riche en amylose (S-ARA), utilisables comme excipients pharmaceutiques gastro-résistants.

Par la suite, deux autres objectifs distincts étaient proposés:

- 1) Réaliser des études sur des comprimés formulés avec des enzymes pancréatiques (α -amylase, lipase et trypsine) à base de l'un ou l'autre des excipients. Trois points devaient être étudiés, soient: i) la capacité des excipients à protéger le ou les enzyme(s) à travers le passage gastrique, ii) le comportement des excipients par rapport aux profils de libération de ou des enzyme(s) dans un milieu simulant les conditions intestinales et iii) la capacité des excipients à permettre la formulation de ou des enzyme(s) à différentes charges en principe actif dans les comprimés.
- 2) Effectuer une étude des propriétés et caractéristiques physico-chimiques des deux excipients utilisés lors de cette étude. Ceci incluait des analyses par spectroscopie d'absorption atomique, par infrarouge (FTIR), par résonance magnétique nucléaire (RMN), par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et par analyse thermogravimétrique (TGA).

Le choix du CM-ARA est dû au fait que cet excipient a déjà montré des propriétés à protéger des microorganismes à travers le passage gastrique pour leur

libération en milieu intestinal. L'étude visait donc à élucider si le CM-ARA pouvait aussi être utilisé dans les formulations avec des enzymes pancréatiques. Le S-ARA est une matrice similaire au CM-ARA, ayant pour différences i) un lien ester au lieu d'un lien éther et ii) une chaîne latérale composée de quatre carbones au lieu de deux. Cet excipient avait été choisi pour permettre une évaluation préliminaire comparative et l'étude des relations structure-fonctions pour les deux matrices mentionnées.

Le présent projet a été effectué dans le cadre du laboratoire du professeur Mateescu de l'Université du Québec à Montréal. Ces travaux faisaient aussi partie d'un contrat de recherche avec Gestion Valéo (2006). L'ensemble des travaux effectués durant la maîtrise est présenté à la figure 3.1.

* * *

Une partie des résultats est déjà publiée ou soumise pour publication. Les résultats des analyses par RMN sont seulement au niveau préliminaire. Les données expérimentales sont obtenues, suite à leurs analyses, feront l'objet d'une valorisation ultérieure.

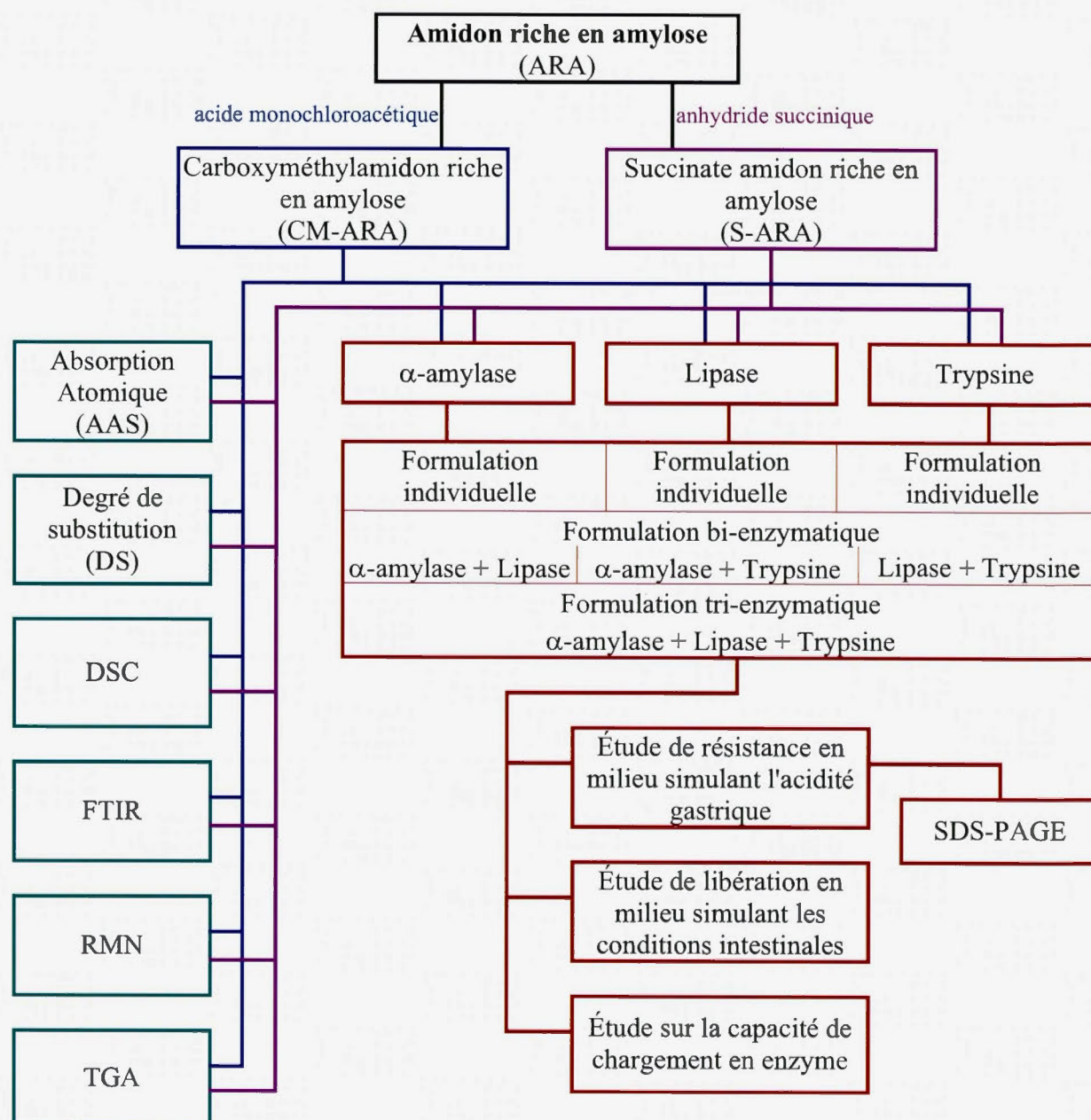


Figure 3.1: Présentation schématique des différentes étapes du projet.

PARTIE II

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE IV

ARTICLE

4.1 Dérivés carboxyliques de l'amidon riche en amylose comme excipients pharmaceutiques: Aspects structuraux et formulations d'enzymes pancréatiques.

Louis Philippe Massicotte, Wilms Emmanuel Baille, Mircea Alexandru Mateescu

Département de Chimie et Centre BioMed, Université du Québec à Montréal,
C.P. 8888, Succursale A, Montréal (Québec), Canada, H3C 3P8.

Le carboxyméthylamidon (CM-ARA) et le succinate amidon (S-ARA) ont été proposés comme excipients pharmaceutiques pour la livraison par voie orale de médicaments, fournissant une protection significative aux enzymes pancréatiques (alpha-amylase, lipase et trypsine) contre l'acidité gastrique comparativement aux enzymes non protégées. Dans le milieu gastrique, les comprimés sont protonés (du moins, en surface) fournissant ainsi des propriétés tampons locales et donnant une forme compacte. Les enzymes ont été formulées individuellement, deux par deux et en formulations comprenant les trois enzymes. Après la première heure d'une incubation (sur une expérience de 2 h) dans un milieu simulant le fluide gastrique (SGF), les trois enzymes ont conservé une activité globale (moyenne des activités des trois enzymes) de 72% lorsque formulées en comprimés avec le CM-ARA et 77% lorsque formulées avec le S-ARA comme excipients. En outre, après l'incubation dans le SGF, la libération de 75% du total de l'activité enzymatique restante dans un milieu simulant le fluide intestinal (SIF), a pris 180 min pour les formulations avec le CM-ARA et 170 min pour celles S-ARA, respectivement. Les deux excipients à base d'amidon carboxylé permettent de hautes capacités de charge (jusqu'à 70-80% en enzymes), ce qui est d'un intérêt majeur dans les thérapies d'enzymes de remplacement pour la pancréatite. Un autre avantage de cette formulation est que la protection gastrique est fournie par les matrices carboxylées, sans enrobage entérique.

Research Paper

**Carboxylated high amylose starch as pharmaceutical excipients.
Structural insights and formulation of pancreatic enzymes**

Louis Philippe Massicotte, Wilms Emmanuel Baille, Mircea Alexandru Mateescu*

Department of Chemistry and Centre BioMed, Université du Québec à Montréal,
Montreal, (Quebec) Canada

* Corresponding author. Address: Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, CP 8888, Succursale A, Montreal, (Quebec) Canada
Tel.: +1 514 987-4319
E-mail address: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Abstract

Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) and succinate high amylose starch (S-HAS) were proposed as pharmaceutical excipients for oral drug delivery, providing a significant gastroprotection to dosage forms of pancreatic enzymes (alpha-amylase, lipase and trypsin) compared to unprotected enzymes. In acidic medium, carboxylic groups are protonated (at least in tablet surface) ensuring local buffering properties and giving a compact shape of the tablets. The enzymes were formulated individually or in association as three enzymes formulation. After the first hour of incubation (over a 2 h experiment) in simulated gastric fluid (SGF), the three pancreatic enzymes retained an overall (average of the three enzymes) activity of 72% when formulated as tablets with CM-HAS excipient and 77% when formulated with S-HAS excipient. Furthermore, after incubation in SGF, the delivery of 75% of the total remaining enzymatic activity in the simulated intestinal fluid (SIF) taken 180 and 170 min for CM-HAS and S-HAS, respectively. Both formulations with carboxylated starch as excipient have a high loading capacity (up to 70-80% enzymes), which is of interest for pancreatic enzymes replacement therapy of pancreatitis. An advantage of these formulations is that gastroprotection is afforded by the carboxylated matrices (carboxylic groups), without enteric coating.

Keywords: Carboxymethyl High Amylose Starch, Succinate High Amylose Starch, Alpha-amylase, Lipase, Trypsin, Oral drug delivery, Pancreatitis, Starch

1. Introduction

The interest in drug delivery systems (DDS) able to release active agents over long periods (controlled delivery) or at a precise location and at a precise time (chrono delivery) is continuously growing. Such delivery, triggered by the environment or other external events makes possible a desired therapeutic effect at the appropriate site and with a drug concentration within the therapeutic window.

A wide range of polymeric matrices, natural or synthetic, is now used as excipients in DDS. For example, hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) was used for formulation of nifedipine (a current vasodilator) [1] and poly-lactic-coglycolic acid (PLGA) devices were used for the delivery of various drug classes (i.e. small molecules, peptides, proteins) and vaccines [2]. Various synthetic matrices such as polyamides, polyamino acids, polyacrylamides, polycyanoacrylates, polyesters, polyurethanes and others have been used for various drug formulations [2]. Starch and its derivatives are largely used in pharmaceuticals as filler, binder or disintegrant [3]. Cross-linked high amylose starch (HAS-CL) has been previously introduced as excipient for monolithic dosage forms able to control drug release over 18-24 hours [4] [5]. Furthermore, acetate (Ac-HAS-CL), aminoethyl (AE-HAS-CL) and carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS-CL) derivatives of HAS-CL were proposed as matrices for drug sustained release, allowing a high drug loading (more than 60%) of tablets [6]. Starch derivatives, including uncross-linked CM-starch and succinate starch (S-starch) are known from more than 40 years, being particularly used in food industries [7]. The CM-starch is not new as excipient for pharmaceuticals. Its sodium salt form is commercialized under different brand names such as Explotab™, Primojel™ and Vivastar P™ mostly as disintegrants [8]. The CM-HAS does not possess disintegrant properties, as previously shown [9].

The novelty of the carboxylated uncross-linked starch consists in their use as excipients for gastro-resistant coating-free oral formulations. Recently, carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) was proposed as a novel excipient for oral tablet formulation [6]. This excipient allowed, for instance, oral formulations of *Escherichia coli*, ensuring protection of bioactive agent in the stomach and its delivery in the intestine [9]. CM-HAS was thought to afford resistance in gastric fluid because of the presence of the carboxylate groups. In gastric (acidic) medium, tablets are protonated (at least in surface) ensuring thus local buffering properties and giving a compact shape of the tablets. Protonated carboxylic groups from neighboring chains can be dimerized by dipole and hydrogen association, stabilizing thus the network [9]. In intestinal medium, protons are changed with sodium ions and tablets swell, releasing the active agent. As for the succinate starch, at our knowledge it was not used until now as pharmaceutical excipient. Since CM-HAS and Succinate HAS (S-HAS) share similar but not identical carboxylated compositions, these matrices were both investigated as novel excipients for oral tablet formulation of pancreatic enzymes in pancreatitis therapy.

The pancreas secretes digestive enzymes (amylase, lipase and trypsin) that help digestion of carbohydrates, fats and proteins in food. Patients with severe pancreatic exocrine dysfunction cannot properly digest food. Steatorrhea and malabsorption due to pancreatic insufficiency are among the important features of chronic pancreatitis. Steatorrhea occurs prior to malabsorption because impaired synthesis and secretion of lipase, its shorter intraluminal survival or the lack of lipase activity which are not compensated by non pancreatic mechanisms [10]. Therefore, for these patients, replacement pancreatic enzymes is required. There are some commercial pancreatic enzymes, most of them formulated with enteric coating such as Cotazyme-S® (Organon Inc., West Orange, NJ), Entolase HP® (A.H. Robins Co. Inc., Richmond, VA), and Zymase® (Organon Inc., West Orange, NJ).

In this study, pancreatic enzymes (α -amylase, lipase and trypsin) were incorporated into CM-HAS and S-HAS matrices, without enteric coating. An advantage of our carboxylated starch matrices is that the whole monolithic is pH sensitive, not only the coating. Moreover, the erosion of these modified starches can be modulated by duodenal α -amylase, enhancing thus the release of bioactive agents. In addition, such coating-free tablet formulations are also easier to produce, particularly at industrial scale. Furthermore, this type of formulation can be advantageous for certain patients with cystic fibrosis, with poor neutralisation of gastric acid in the duodenum [11]. In these cases, enteric coatings are not always suitable for pancreatic enzyme formulations. The aim of the study was to evaluate *in vitro* whether CM-HAS and S-HAS can ensure gastric protection of therapeutic agents against acidic/enzymatic denaturation and to determine the pattern of their liberation once the tablets are in the intestinal neutral pH.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

High amylose starch (Hylon VII) was from National Starch (USA). Microbial α -amylase from *Bacillus species* (EC 3.2.1.1, with a specific activity of 839 units/mg solid), microbial lipase from *candida rugosa* (EC 3.1.1.3, with 1180 units/mg solid), porcine pancreatic trypsin (EC 3.4.21.4, with 16000 units/mg solid) and porcine stomach mucosa pepsin (EC 3.4.23.1, with 378 units/mg solid), as well as the other reagents, were obtained from Sigma-Aldrich Corp (USA) and were used without further purification.

2.2 Carboxymethyl high amylose starch synthesis

The excipient was synthesized following Mulhbacher et al. [6] with minor modifications. A quantity of 70 g of Hylon VII (HAS) was suspended in 150 mL of H₂O, stirred at 50 °C and then 200 mL of 1.7 M NaOH were added continuing the stirring for another 20 min at 50 °C. A volume of 45 mL of 10 M NaOH and then 36 g of monochloroacetic acid (MCA) dissolved in minimal H₂O volume, were added to the mixture and stirred for 1 h. The mixture was neutralized with acetic acid and cooled at room temperature. Salt ions were removed by washing the slurry with a solution of acetone/H₂O (7:3, v/v) followed by repeated filtration and resuspension. The slurry was then precipitated with acetone, filtered and the CM-HAS was recovered. The material was dried at air overnight.

2.3 Succinate high amylose starch synthesis

An amount of 70 g of HAS was suspended, as for CM-HAS, in 150 mL of H₂O (under stirring at 50 °C). Then a volume of 200 mL of 1.7 M NaOH was added to the mixture, keeping the stirring at 50 °C for 60 min. The pH was then adjusted to 8.0 with acetic acid, the mixture was cooled-down to room temperature and the medium was adjusted to 1.3 L with H₂O. A quantity of 11 g of succinic anhydride was then added to the mixture keeping the pH for reaction between 8.0 and 8.4 with 1 M NaOH. Once the pH is

stabilized, the stirring was continued for another 10 min. Salt ions removing, washing the slurry, S-HAS recovery and powder drying were done as for CM-HAS.

2.4 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

FTIR spectroscopic analysis was carried out using a BOMEM (Hartmann & Braun) spectrophotometer (Model MB-series, Quebec City, Canada). Before analysis, HAS, CM-HAS and S-HAS powders were dried and stored in a desiccator prior to prepare KBr disc. Samples of 10 mg of HAS, CM-HAS or S-HAS were respectively mixed with 90 mg of KBr and about 20 mg was used to compress (6 T) a thin disc of 9 mm diameter. Spectra from 4000 and 400 cm^{-1} were recorded at 4 cm^{-1} resolution with a total of 48 scans for each sample.

2.5 Determination of the degree of substitution

a) Potentiometric titration of carboxylic groups

The degree of substitution (DS) was determined by potentiometric titration of carboxyl groups with 0.2 M NaOH solution and expressed in mEquivalents of functional groups per gram of polymeric powder (mEquiv/g). A quantity of 1.5 g of matrix was suspended in 40 mL 0.1 M HCl solution for 20 min under stirring (for conversion of carboxylate groups into carboxylic groups), then filtrated and washed with acetone/ H_2O (7:3) to eliminate HCl excess. The powder was then washed with acetone and dried. A mass of 1 g was dissolved in 50 mL H_2O and titrated. This value was converted in DS (as percentage of the hydroxyl groups) on the polymer that have been substituted from the total number of available hydroxyl groups.

b) Sample Hydrolysis and determination of the degree of substitution by ^1H -NMR

The CM-HAS sample was hydrolyzed for determination of the degree of substitution. A quantity of 0.1 g of CM-HAS was dispersed in 1 mL of perchloric acid (70%), and after 10 min at room temperature it was diluted with 9 mL of distilled water. This mixture was kept at 90 °C overnight. The obtained solution was neutralized with 2 M KOH and kept at 4 °C for 4 h until a complete precipitation of the KClO_4 . The salt was filtered off and the solution obtained was freeze-dried. The dry product was dissolved in D_2O and

^1H -NMR spectrum was measured at 90 °C on a Varian Gemini 300 operating at a frequency of 300.0 MHz for Protons. Measurement was performed using 128 scans with a repetition time of 30 s.

2.6 Atomic Absorption Spectroscopy

Solutions containing 200 mg/L of pregelatinized and retrograded (R) HAS, 10 mg/L of CM-HAS or 10 mg/L of S-HAS were dissolved in nanopure water and filtered on a 0.45 μm filter before they undergo desolvation and vaporization in a high-temperature acetylene-air flame [SpectrAA 220FS atomic absorption spectrometer (Varian)]. A standard curve was made using NaCl (0.2 to 1 mg/L) dissolved in nanopure water. Sodium contained in the solutions was determined at 589 nm (Na lamp).

2.7 Differential scanning calorimetric (DSC) analysis

Heat properties of starch and of its carboxymethyl and succinyl derivatives were studied using a DSC analyzer [TA Instrument, Model 2910, New Castle (Delaware), USA], at a heating rate of 10 °C/min between 25 and 240 °C. The instrument was first calibrated with two empty compacted aluminum pans (baseline calibration). A second step of calibration was done with an empty compacted aluminum pan as reference and a compacted aluminum pan containing indium as standard. Each sample was placed in an aluminum pan, compacted, and scanned under helium flow, with an empty pan as reference.

2.8 Thermogravimetric Analysis (TGA)

Thermogravimetric decomposition analysis was performed with a TA Instrument [Model 2950 Hi-Res, New Castle (Delaware), USA] under nitrogen atmosphere at a heating rate of 20 °C/min, between 25 and 800 °C. Before analysis, the instrument was calibrated with calcium carbonate as reference material.

2.9 Direct compression of tablets

The excipient powder (CM-HAS or S-HAS) was mixed manually with the bioactive agent [enzyme(s)] powder(s) until complete homogenization. No other component (lubricant, glidant, etc) or coating were added. Tablets (9 mm diameter, 2 mm thickness) of 200 mg (total weight) were obtained by direct compression at 3.0 T (Carver hydraulic press) of the corresponding mixed powders of excipient and bioactive agent.

2.10 Determination of the enzymatic activities

The α -amylase activity was determined by the reductimetric method of Noelting and Bernfeld [12] using dinitrosalicylic acid (DNS) to reveal (535 nm) the reducing products of amylolysis (maltose and dextrans). The enzyme was incubated 3 min at room temperature with 1% soluble starch as substrate and stopped with DNS reagent.

The lipase activity was determined following Cherry and Crandall [13], using an emulsion of olive oil as substrate. Practically, 4.5 mL olive oil, 18 mL H₂O, 2.5 mL 0.2 M Trizma buffer (pH 7.7), 2.5 g gum arabic, 1 mL of solution containing 0.015 M CaCl₂, 1.2 M NaCl and 0.011 M Sodium taurodexoycholate. A volume of 2.5 mL of emulsion was incubated for 2 h at 37 °C with 200 μ L of enzyme solution. Two drops of thymolphthalein 0.9% (w/v) pH indicator was added to the emulsion and the enzymatic activity was determined by the titration of the product (oleic acid) with 0.2 M NaOH until the solution turned to a light blue color.

The trypsin activity was determined by the method of Bergmeyer and al. [14] using a 0.67 mM sodium phosphate buffer (PB) solution (pH 7.6) containing 0.25 mM N α -Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester (BAEE). A volume of 200 μ L of the enzymatic solution was placed in 3 mL of BAEE solution. The increase of absorbency at 253 nm was recorded at room temperature for 5 min and the $\Delta A_{253\text{nm}}/\text{min}$ was used to determine the enzymatic activity.

2.11 Stability of pancreatic enzymes formulated with CM-HAS and S-HAS in simulated gastric fluid (SGF)

Tablets (200 mg) based on CM-HAS or S-HAS and were formulated to contain 10, 15 or 20 mg of each enzyme (depending of the enzyme activities and the sensibility of the enzymatic assays). Tablets were placed individually in 50 mL of SGF (pH 1.2 containing 2560 - 8000 units/mL of pepsin) [15], for different times at 37 °C under constant agitation at 50 rpm in a Controlled environment incubator shaker (New Brunswick Scientific Co. Inc., N.J., USA) After each chosen period of incubation in SGF, the tablets were transferred into 50 mL of 50 mM PB (pH 7.2) and crushed in order to release the enzymatic activities to be evaluated. The values were normalized, considering the maximal enzymatic activity released after SGF treatment and total tablet dissolution in SIF, as 100%. Native free (non formulated) pancreatic enzymes and enzymes formulated with retrograded HAS (non substituted) were incubated in SGF in similar conditions.

2.12 Delivery of enzymes in the simulated intestinal fluid (SIF)

Tablets based on CM-HAS or S-HAS and containing 10 to 20 mg of each enzyme, were placed individually in 50 mL of SGF for 1 h at 37 °C under constant agitation (50 rpm) in the controlled environment incubator shaker. The tablets were then transferred in 50 mL SIF (50 mM PB, pH 7.2) in the same conditions (50 rpm, 37 °C) and small aliquots (10 to 200 µL) were taken at regular intervals to determine the enzymatic activity released in function of time.

2.13 Loading capacity of CM-HAS and S-HAS with active agent

Tablets of 200 mg (total weight) based on CM-HAS or S-HAS and containing 10, 20, 40, 80, 120, 160 or 200 mg of each enzyme, were placed individually in 50 mL of SGF (1 h at 37 °C under 50 rpm agitation) using the incubator shaker. After the incubation period in SGF, the tablets were transferred into 50 mL of 50 mM PB (pH 7.2) and then crushed. Each enzymatic activity was determined by the methods described above.

2.14 Polyacrylamide gel electrophoresis

For SDS-PAGE [16], gels (10-12%, 0.75 mm spacers and 10 wells combs) were loaded with: i) 30 μ g of individual native free pancreatic enzyme; ii) 30 μ g of the enzyme formulated with CM-HAS or S-HAS; iii) 30 μ g of free enzyme after 120 min of incubation in SGF (37 °C, 50 rpm) and iv) 30 μ g of the enzyme formulated with CM-HAS or S-HAS after 120 incubation in SGF (37 °C, 50 rpm). The tablets (200 mg) loaded with 20 mg α -amylase, lipase or trypsin and each free enzyme were separately maintained (incubator shaker) at 37°C and 50 rpm for 2 h in 25 mL of SGF (pH 1.2) containing pepsin or, as a positive control, dissolved in 25 mL of 50 mM PB (pH 7.2). After the incubation period, the SGF was brought to pH 7.2 with 1 M NaOH solution. After a complete disintegration of the tablets, a volume of 400 μ L of each enzymatic solution was precipitated with acetone (1:5 v/v) at -20 °C, centrifuged, dried and dissolved in 125 μ L of a standard electrophoresis solution containing bromophenol blue. The gels were loaded with: standard broad range molecular weight (lane 1 & 8), native enzyme (lane 2), enzyme formulated with CM-HAS incubated in PB but not in SGF (lane 3), enzyme formulated with S-HAS and incubated in PB but not in SGF (lane 4), native free enzyme incubated in SGF (lane 5), enzyme formulated with CM-HAS and incubated in SGF (lane 6), enzyme formulated with S-HAS and incubated in SGF (lane 7). The gels for α -amylase and lipase (10% bis-acrylamide) and for trypsin (12% bis-acrylamide) were run at 120 volts until the migration front (bromophenol blue) reaches the end of the gel. The gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250 and patterns photographed with a digital camera.

3. Results and Discussion

The CM-HAS is a starch derivatized with a two-carbon carboxymethyl group linked as an ether (Scheme 1a) whereas S-HAS is derivatized with a four carbons group via an ester bond (Scheme 1b).

3.1 Structural Aspects

The FTIR spectra of HAS and of its carboxymethyl (Fig. 1a) and succinyl (Fig. 1b) derivatives indicate the presence of the carboxyl functions (a new peak at 1618 cm^{-1} which corresponds to a carboxylate salt). As expected, the succinylation of starch shows (Fig. 1b) two characteristic absorptions, an ester peak at 1738 cm^{-1} and a carboxylate peak at 1580 cm^{-1} . These results (Table 1) confirm that carboxymethylation and succinylation occurred, as expected.

Both excipients are carboxylated starch and were synthesized in conditions chosen to give DS close to each other (i.e. 5.1% for CM-HAS and 5.6% for S-HAS). It is known that cellulose and starch carboxymethylation occurs, as a general rule, at various rates for different hydroxylic groups to be substituted. Zhang et al. reported by NMR spectroscopy that carboxymethylation of starch yields a hydroxyl substitution preference decreasing in order: $-\text{OH}$ in C2 $>$ $-\text{OH}$ in C6 $>$ $-\text{OH}$ in C3 [17].

The DS was also detected by ^1H -NMR spectrum of the hydrolyzed CM-HAS (perchloric acid) [18] which also allow to evaluate the distribution of the CM functional group within the glucose units. Figure 2 shows the assignment of the peaks for CM-HAS and the DS values corresponding to the peaks were determined using the equations of Heinze et al. [18]. The results obtained show that mostly the position 2 (DS 5.7%) and 3 (DS 2.3%) on the glucose units have been substituted. This suggests that the reactivity of position 3 is at least three times lower than position 2 of glucose units of starch due to

the overall conformation. The total DS value (DS 8.0%) obtained by ^1H -NMR spectroscopy fits well the one determined by titration (DS 5.1%).

As expected, a quantity of salt remained in the excipients even after washing the polymer. The atomic absorption data showed that the CM-HAS and S-HAS powders contained respectively, 4.82% and 6.25% sodium (w/w), whereas retrograded HAS (partly recrystallized high amylose starch) contained only 0.31%. The difference in the sodium content between the two carboxylated excipients is rather limited to affect their properties.

Differential scanning calorimetric (DSC) analysis

DSC analyses of HAS and of its carboxymethyl and succinyl derivatives show that the amount of crystalline domains of succinyl derivative is more important than that of HAS and of carboxymethyl derivative (Fig. 3a). The change in enthalpy (ΔH) obtained for the succinyl derivative is 1.7 times that of HAS, whereas values of ΔH close each other were found for starch and its carboxymethyl derivative (Table 2). However, the temperatures of fusion suggest that the overall crystalline domain of starch is larger than that of the two derivatives because for HAS the temperature needed to breakup these domains, is higher (Table 2). This behavior is in line with the tendency of HAS to generate ordered V (simple helix) structure at gelification, stabilized by hydrogen bonding. For derivatives, the formation of starch V structure is supposed to be, in part hindered by the presence of carboxymethyl or succinyl functions. The carboxyl function can contribute at stabilization by hydrogen or by dipole association despite less V order of the macromolecule.

Thermogravimetric Analysis (TGA)

The water and volatile content of 10% (Table 3) fits well with the known 5-10% water content of starch. TGA profiles illustrated in Fig. 3b show that thermal stability of CM-HAS derivative is higher in comparison to that of native HAS, as clearly illustrated by the temperature corresponding of 10% of mass loss (degradation of 10% of the mass of the polymer, excluding water and volatile) (Table 3). For instance, $T_{10\%}$ for HAS was 244 °C whereas for CM-HAS derivative, $T_{10\%}$ increases to 272 °C. However, when compared with HAS, the $T_{10\%}$ of S-HAS shows a moderate decreased effect on the degradation profile. This opposite tendency between HAS and its carboxymethyl and between HAS and its succinyl derivatives can be explained by the difference in the type of substitution (ether for CM-HAS and ester for S-HAS) and in the nature of functional groups (hydroxyl and carboxyl). It is well documented that the thermal stability of starch increases with increasing degree of substitution (in the case of succinyl derivative with low DS versus high DS [18] [19] [20], the greater stability of the esters was explained by the lower amount of remaining hydroxyl groups after esterification [21]). Since the main decomposition mechanism of starch is the dehydration reaction between starch hydroxyls, the lower the amount of hydroxyl groups remained, the better is the thermal stability of the starch esters [21]. When starch contains functional groups (i.e. carboxyl or hydroxyl), it is expected that the polymer degradation would be facilitated (due the formation of CO_2 or H_2O). When formulated as tablets, if the functional groups (hydroxyl, carboxyl) of neighboring chains of the starch are close enough to allow hydrogen bonding, this can help to stabilize the tablet.

3.2 Stability of pancreatic enzymes formulated with CM-HAS and S-HAS in simulated gastric fluid (SGF)

The free (non formulated) enzymes were, each of them, practically inactivated in less than 30 min of incubation in SGF (with pepsin): α -amylase lost 98% of its initial

activity in 5 min, lipase 97% of initial activity in less than 10 min and trypsin 92% of activity within 30 min (Fig. 4).

When 10 mg α -amylase as active agent was formulated with the CM-HAS excipient in tablets of 200 mg, the enzyme conserved after 60 min incubation in SGF, 75% of the initial activity (Fig. 4a) and when formulated with S-HAS excipient, it retained 51% of activity (Fig. 4b). The lipase (20 mg) conserved 69% of its initial activity when formulated with CM-HAS (Fig. 4a) and only 37% with S-HAS as excipient (Fig. 4b). Trypsin (10 mg) retained 66% of initial enzymatic activity when formulated with CM-HAS (Fig. 4a) and 56% of its activity when formulated with S-HAS (Fig. 4b). Therefore, when the enzymes are formulated individually, CM-HAS affords a better protection than S-HAS, for the same incubation time in SGF. An explanation can be a hydrolytic partial esterolysis of succinate protective function in gastric acidity. In fact, the added carboxymethyl group on starch in the case of CM-HAS is linked by an ether bond which is more resistant than the succinate group of the S-HAS (ester bond susceptible to esterolysis). By being susceptible to lose its substitute, the stability is also partly lost.

The loading of tablets for this stability study was deliberately low (10-20 mg enzyme) in order to have a clear effect of the carboxylated starch matrices (thus associative effects protein-protein that can occur at high loading and altering stability data, are avoided).

The protection afforded by CM-HAS and S-HAS to the pancreatic enzymes was also evaluated by SDS-PAGE (Fig. 5). The free α -amylase incubated in SGF (Fig. 5a, line 5) was clearly irreversibly denaturated (with two distinct bands of lesser molecular weight), whereas when formulated, was not (lines 6 and 7). The free lipase was also totally denaturated (Fig. 5b, lane 5) whereas when formulated with CM-HAS or S-HAS the enzyme is only in part denaturated. Lastly, the gel containing trypsin (Fig. 5c) shows that the free enzyme incubated in SGF did not exhibit any band characteristic to the

native enzyme whereas when formulated with CM-HAS or S-HAS, the electrophoretic patterns are similar with those of native enzyme. The enzymes formulated with CM-HAS and S-HAS and incubated for 120 min in SGF migrate at the same level as the native, non-denaturated enzymes, showing a good protection afforded by the two carboxylic excipients. Therefore, both carboxylated excipients afford gastro-protection as shown by lanes 6 and 7, each with a prominent band characteristic of native enzyme. This is in agreement with the results displayed on Fig. 4 showing that the excipients did not provide an absolute protection against gastric denaturation. On the other hand, compression at 3 T did not affect electrophoretic mobility (line 3, 4, 6 and 7 of the three enzymes).

When all three enzymes (15 mg each) are formulated together with CM-HAS, the enzymes conserved after 60 min incubation in SGF an overall pancreatic activity (conventionally considered as an average of contribution of each enzyme in the enzyme formulation) of 72% (60.6% α -amylase, 87.4% lipase and 68.6% trypsin) from the initial activity (Fig. 6a). When formulated with S-HAS, they conserved an overall pancreatic activity of 77% (74.0% α -amylase, 86.9% lipase and 70.6% trypsin) from the initial activity (Fig. 6b). The S-HAS provides a slightly higher protection than CM-HAS formulations, mostly because α -amylase receives a markedly better protection when formulated with S-HAS than with CM-HAS. These results suggest possible interactions (ionic or hydrogen bonds) between the carboxylic matrices and the formulated proteins, affecting thus the tablet properties and the delivery kinetics.

It is worth to mention that the shape of the tablets [a relatively thin disc with a high surface/volume (S/V) ratio] can be considered as a particular case to evaluate the gastro-protection. Tablets with a different shape (oval shape caplet with a lower S/V ratio) would probably afford a better protection to the enzymes. Our matrices can also be used in double core tablets where the external dry coating is done with the same carboxylated starch excipient, without additional coatings [22]. Eliminating the need for enteric

coating allows for a wider variety of tablet shapes, since the behavior of the tablets in the fluidized bed coating pans do not have to be taken into consideration for the tablet design. An interesting property of these starches is that they can be slowly hydrolyzed by the duodenal α -amylase, modulating thus the drug delivery not only by pH but also enzymatically.

Variations of DS of CM-HAS matrices (5.1% and 3.3%) and of S-HAS (5.6% and 6.6%) generate some differences in terms of enzyme protection against gastric denaturation. When 15 mg of each of the three enzymes are all together formulated with CM-HAS (DS 3.3%) and incubated for 1 h in SGF, an overall activity of 76% (62.3% α -amylase, 85.0% lipase and 81.7% trypsin) was preserved (figure not shown), maintaining lipase and α -amylase and moderately increasing the recovered trypsin activity. When 15 mg of each enzymes are formulated all together with S-HAS with a slightly higher DS (6.6%), after 1 h incubation in SGF, the overall activity preserved was moderately increased at 85% (73.9% α -amylase, 98.3% lipase and 83.3% trypsin) (figure not shown) mostly due to better protection provided to lipase and trypsin activities. Further studies are still needed for optimization of DS, considering that minor chemical alterations of starch macromolecules [4] can generate modifications that can be of interest for stability of the formulated enzymes.

3.3 Delivery of the pancreatic enzymes in the simulated intestinal medium

After 1 h in SGF, formulations of 10 mg of α -amylase with CM-HAS released 75% of the enzyme after 140 min (Fig. 7a) while the enzyme formulated with S-HAS needs 84 min to achieve the same release (Fig. 7b). Formulation of 20 mg of lipase with CM-HAS gives a release particularly long: about 10% of the total enzymatic activity released after 630 min (Fig. 7a) while with S-HAS excipient 75% of the total enzymatic activity of lipase was released after 295 min (Fig. 7b). Formulation of 10 mg of trypsin with S-HAS excipient released 75% of the total enzymatic activity after 90 min (Fig.

7a), while formulations with CM-HAS, give again very long release times (the structures of tablets remain intact, showing very little degradation) with less than 10% of the total trypsin enzymatic activity liberated after 405 min (Fig. 7b). It appears that the active agent remains trapped inside the tablets since once the tablets are manually broken down, the enzyme activity released is high (Fig. 4). This behavior of CM-HAS tablets suggests some kind of interaction between the excipient and lipase and between the excipient and trypsin.

When all three enzymes (15 mg each) are formulated together with either CM-HAS or S-HAS, the liberation pattern showed substantial differences in comparison with the patterns of enzymes formulated individually. For CM-HAS, 75% of the overall enzymatic activities is released in about 180 min (Fig. 8a) and when formulated with S-HAS, the same percentage of the initial enzymatic activity is released after 170 min (Fig. 8b). The differences in the delivery patterns (Fig. 8) can be explained by the ways in which the tablets release their bioactive agent. CM-HAS tablets tend to slowly swell followed by disintegration. This provides first a period with no significant release of active agent and then a relatively fast release. On the other hand, S-HAS tablets release the bioactive agents in two ways: swelling and tablet erosion. These two processes allow for S-HAS release that occurs sooner but over a longer duration. Both formulations achieve a complete release of the bioactive agents more or less after the same period of time.

In order to better understand certain disparities between the results with enzymes formulated individually (10 to 20 mg per tablet) and with the three enzymes combined together (45 mg per tablet), various combination with only two enzymes were formulated in a tablet. When only α -amylase and lipase (15 mg each) are formulated with CM-HAS, 75% of their total enzymatic activities were released within 98 min (Fig. 9.1a), while it takes 145 min when the two enzymes are formulated with S-HAS (Fig. 9.1b). When combining only α -amylase and trypsin (15 mg each) with CM-HAS,

75% of the total enzymatic activity is released in 125 min (Fig. 9.2a) and in 130 min for the two enzymes formulated with S-HAS (Fig. 9.2b). These formulations of two enzymes show minor differences between CM-HAS and S-HAS in terms of the release time. Furthermore, for both excipients the release from these bi-enzyme formulations was faster than that of the formulation with all the three enzymes.

The results are different with formulations combining trypsin and lipase (15 mg each). When these two enzymes are formulated together with CM-HAS, 75% of the total enzymatic activity is released at 405 min (Fig. 9.3a) and when formulated with S-HAS, it takes 295 min for the same level of liberation (Fig. 9.3b). These longer release times for these two enzymes combination are, for both excipients, between the release times of individual and of the three enzymes formulations. This behavior suggests some kind of association trypsin-lipase explaining thus a shorter release time than for these enzymes individually formulated with CM-HAS (with particularly long release times, probably due to interactions between these enzymes and the matrix).

An aspect of interest in these experiments is that both starch excipients, although modified, are poor substrates for α -amylase. Further experiments (data not shown) indicated that CM-HAS and S-HAS are about 3.2 and 4.6 times poorer (respectively) as substrate than soluble native starch. However, it is not surprising that in presence of water, the enzyme still degrades the polymeric matrix thus hastening the tablet and plays a role in the faster release from CM-HAS compared to S-HAS (Fig. 9.1 and 9.2).

When using CM-HAS with a lower DS (3.3% instead of 5.1%), the release time of 75% was linearly decreased (from 180 to 118 min) for the overall enzymatic activity of the three enzymes formulation (15 mg of each enzyme combined all together), suggesting a role of DS in the release properties of the excipient (figure not shown). In case of S-HAS, the differences were less important (155 min for DS 6.6% and 170 min for DS 5.6%).

3.4 Loading capacity of CM-HAS and S-HAS with active agent

It was found a linear dependency between the number of α -amylase units released and the number of α -amylase units initially contained by the tablets of CM-HAS or S-HAS, up to 40% and almost linear up to 70% loading with enzyme (Fig. 10). Moreover, it was found that although gradually losing linearity, tablets were in good shape and preserved the enzymatic activities against gastric acidity (1 h incubation in SGF) even when loaded with 80% active agent.

For tablets formulated with lipase, the enzymatic activity released was in a linear dependency with the enzyme content up to 20% loading for both CM-HAS (Fig. 10a) and S-HAS (Fig. 10b), with the mention that the release of enzymatic activity continued to increase up to 80% loading. As a control, tablets made entirely of lipase (200 mg), after 1 h incubation in SGF, possess a remaining enzymatic activity lesser than that of tablets with 40% enzyme (80 mg) with CM-HAS or S-HAS as excipients, in the same conditions. The decrease of activity at high loading can be explained by a lower ratio of carboxylated matrix:enzyme(s). At this low ratio the matrix cannot afford enough gastric protection. This clearly shows that the presence of carboxylated starch excipients is important for formulation.

Tablets loaded with trypsin showed a linear dependency with the enzyme content up to 80% for CM-HAS (Fig. 10a) and up to 60% for S-HAS (Fig. 10b). High drug loading formulations have also been obtained with CM-HAS-CL [23]. In the present formulations, although CM-HAS and S-HAS are not cross-linked, the loading is also high, probably due to interactions of proteins with the excipients. This is an important advantage of our carboxylated starch formulation, considering the high cost of the enzymes. Another advantage of these carboxylated high amylose starch excipients is that they afford gastroprotection without additional enteric coating.

In conclusion, the carboxylated starch derivatives ensuring good shape of tablets in acidic medium and gastroresistance afforded by the matrices (not by coating) even at high drug loading, represent interesting excipients for pharmaceutical formulations.

Acknowledgements

Thanks are due to Gestion Valeo for financing the project and to Dr. Alain Richard for his interest and useful discussions.

References

- [1] N. Kohri, K. Mori, K. Miyazaki, T. Arita, Sustained release of nifedipine from granules, *J. Pharm. Sci.* 75 (1986) 57--61
- [2] R.A. Jain, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices, *Biomaterials* 21 (2000) 2475--2490.
- [3] H. Roper, Application of starch and its derivatives, *Carbohydr. Eur.* 15 (1996) 14--21.
- [4] V. Lenaerts, Y. Dumoulin, M.A. Mateescu, Controlled Release of Theophylline from Cross-Linked Amylose Tablets, *J. Control. Rel.* 15 (1991) 39--46.
- [5] V. Lenaerts, I. Moussa, Y. Dumoulin, F. Mebsout, F. Chouinard, P. Szabo, M.A. Mateescu, L. Cartilier, R.H. Marchessault, Cross-linked high amylose starch for controlled release of drugs: recent advances, *J. Control. Rel.* 53 (1998) 225--234.
- [6] J. Mulhbachter, P. Ispas-Szabo, V. Lenaerts, M.A. Mateescu, Cross-linked high amylose starch derivatives as matrices for controlled release of high drug loadings, *J. Control. Rel.* 76 (2001) 51--58
- [7] O.B. Wurzburg, *Modified Starches: Properties and uses*, CRC Press, FL, 1986, pp. 132--136 and pp. 187--188
- [8] S. Edge, D.F. Steele, J.N. Staniforth, A. Chen, P.M. Woodcock, Powder compaction properties of sodium starch glycolate disintegrants, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28 (2002) 989--999
- [9] C. Calinescu, J. Mulhbachter, E. Nadeau, J.M. Fairbrother, M.A. Mateescu, Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60 (2005) 53--60.
- [10] P. Layer, J. Keller, P.G. Lankisch, Pancreatic enzyme replacement therapy, *Curr. Gastroenterol. Rep.* 3 (2001) 101--108
- [11] J.Y. Choi, D. Muallem, K. Kiselyov, M.G. Lee, P.J. Thomas, S. Muallem, Aberrant CFTR-dependent HCO_3^- transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature* 410 (2001) 94--97.

- [12] G. Noelting, P. Bernfeld, Diastatic enzymes. III. α -amylase: determination of activity and control of absence of α -amylase, *Helv. Chim. Acta* 31 (1948) 286--290.
- [13] R.J. Henry, C. Sobel, S. Berkman, On the Determination of "Pancreatitis Lipase" in Serum, *Clin. Chem.* 3 (1957) 77--89
- [14] H.U. Bergmeyer, K. Gawehn, M. Grassl, Trypsin, in H.U. Bergmeyer (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Volume I, 2nd edn, Academic Press, Inc., New York, NY, 1974, pp. 515--516
- [15] * * *, U.S. Pharmacopeia & National Formulary, National Publishing, PA, 2000, pp. 2235
- [16] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680--685.
- [17] J. Zhang, D. Wu, D. Li, G. Li, Study on substituent group distribution of carboxymethyl starch ether by nuclear magnetic resonance, *Huaxue Shijie* 33 (1992) 129--131.
- [18] T. Heinze, P. Talaba, U. Heinze, Starch derivatives of high degree of functionalization. 1. Effective homogeneous synthesis of p-toluenesulfonyl (tosyl) starch with a new functionalization pattern, *Carbohydr. Polym.* 42 (2000) 411--420.
- [19] S. Thiebaud, J. Aburto, I. Alric, E. Borredon, D. Bikaris, J. Prinos, C. Panayiotou, Properties of fatty-acid esters of starch and their blends with LDPE, *J. Appl. Polym. Sci.* 65 (1997) 705--721.
- [20] J.M. Fang, P.A. Fowler, J. Tomkinson, C.A.S. Hill, The preparation and characterisation of a series of chemically modified potato starches, *Carbohydr. Polym.* 47 (2002) 245--252.
- [21] E. Rudnik, G. Matuschek, N. Milanov, A. Kettrup, Thermal properties of starch succinates, *Thermochimica Acta* 427 (2005) 163--166.
- [22] P. Ispas-Szabo, C. Calinescu, M.A. Mateescu, Gastro-Resistant Oral Dosages Based on Carboxymethyl High Amylose Starch, *Transactions of 33rd Meeting of Controlled Release Society*, Vienna, 2006, Abstr. 843.

[23] M.A. Mateescu, P. Ispas-Szabo, J. Mulhbach, Cross-linked starch derivatives for highly loaded pharmaceutical formulations, in: R. Marchessault, F. Ravenelle, X.X. Zhu (Eds.), Polyysaccharides for drug delivery and pharmaceutical applications, ACS Symposium Series 934, Oxford University Press, Philadelphia, 2006, pp. 121--137.

Tables

Table 1: FTIR of HAS and its carboxymethyl and succinyl derivatives

| Samples | Wavenumber (cm^{-1}) | |
|---------|---------------------------------|-------------------|
| | Ester group | Carboxyl group |
| HAS | — | — |
| CM-HAS | — | 1618 ^a |
| S-HAS | 1738 ^b | 1580 ^a |

^a Predicted values are between 1610 and 1550 for carboxylate function

^b Predicted values are between 1750 and 1725 for ester function

Table 2: DSC analysis of HAS and of its carboxymethyl and succinyl derivatives

| Samples | DSC characteristics of peaks | | |
|---------|---|--|--------------------|
| | T_{onset} ($^{\circ}\text{C}$) | T_{peak} ($^{\circ}\text{C}$) | ΔH_f (J/g) |
| HAS | 180 | 191 | 204 |
| CM-HAS | 173 | 177 | 218 |
| S-HAS | 91 | 124 | 350 |

Table 3: TGA of HAS and its carboxymethyl and succinyl derivatives.

| Samples | TGA characteristics of peaks | | |
|---------|------------------------------|-----------------------------------|--|
| | Volatile (water) content (%) | $T_{10\%}$ ($^{\circ}\text{C}$) | T_{peak} ($^{\circ}\text{C}$) |
| HAS | 10 | 244 | 262 |
| CM-HAS | 10 | 272 | 286 |
| S-HAS | 10 | 232 | 259 |

Legends of Figures

Scheme 1. Structures of (a) carboxymethyl high amylose starch and (b) succinate high amylose starch.

Fig. 1. FTIR spectra of HAS and its (a) carboxymethyl and (b) succinyl derivatives.

Samples of 10 mg of HAS, CM-HAS or S-HAS were respectively mixed with 90 mg of KBr and about 20 mg was used to compress (6 T) a thin disc of 9 mm diameter. Arrows indicate peaks generated by derivatisation.

Fig. 2. ^1H -NMR spectrum of CM-HAS. Peak assignment: H-1 (hydrogen atom at the anomeric carbon); α , β (configuration of glucose); S (substituted position); u (unsubstituted position) and O (oxygen atom at position 2 and 3).

Fig. 3. DSC (a) and TGA (b) of HAS and its carboxymethyl and succinyl derivatives.

For each DSC run, samples (5 - 10 mg powder) were heated at a rate of 10 °C/min between 25 and 240 °C ($n = 2$). For, thermogravimetric decomposition the heating rate was of 20 °C/min, between 25 and 800 °C ($n = 2$).

Fig. 4. Stability in SGF of α -amylase, lipase or trypsin formulated with (a) CM-HAS or (b) S-HAS. The tablets (200 mg) loaded with 10 mg α -amylase or 20 mg lipase or 10 mg trypsin, were incubated in 50 mL of SGF containing pepsin in an incubator shaker (37 °C, 50 rpm). The tablets were then transferred in 50 mL of 50 mM PB (pH 7.2), crushed and the liberated enzymatic activity was determined ($n = 3$).

Fig. 5. SDS-PAGE electrophoretic patterns of (a) α -amylase, (b) lipase and (c) trypsin, in native form or in tablets formulated with CM-HAS or S-HAS. The gels were loaded as: lanes 1 & 8 standard broad range molecular weight, lane 2 native

enzyme, lane 3 enzyme formulated with CM-HAS, incubated in PB but not incubated in SGF, lane 4 enzyme formulated with S-HAS, incubated in PB but not in SGF, lane 5 native free enzyme incubated in SGF, lane 6 enzyme formulated with CM-HAS and incubated in SGF, lane 7 enzyme formulated with S-HAS and incubated in SGF.

Fig. 6. Stability in SGF of α -amylase, lipase and trypsin formulated together with (a) CM-HAS or (b) S-HAS. The tablets (200 mg) formulated with 15 mg α -amylase, 15 mg lipase and 15 mg trypsin, were incubated in 50 mL SGF containing pepsin in the incubator shaker (37 °C and 50 rpm). The tablets were then transferred in 50 mL of 50 mM PB (pH 7.2), crushed and each enzyme activity was measured (n = 3). Tablets (200 mg) containing 15 mg of each enzyme, formulated with (R)-HAS, were incubated following the same experimental method above (n = 1).

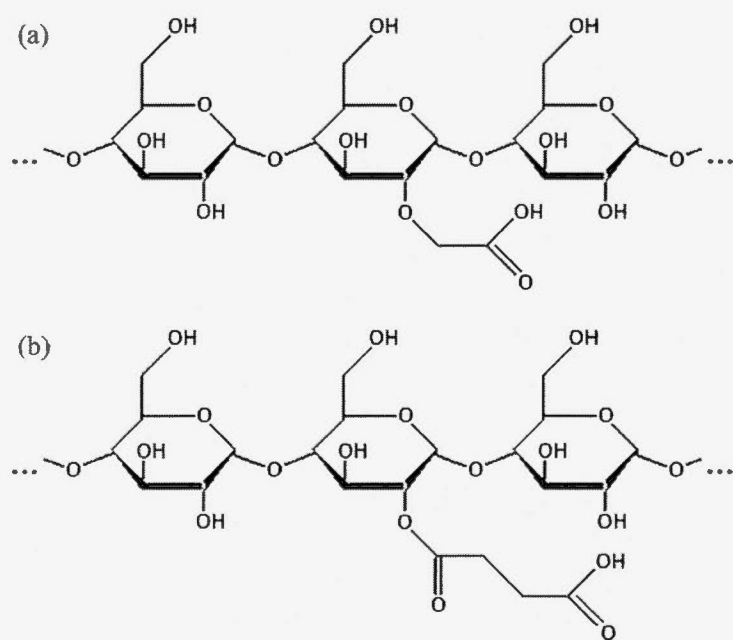
Fig. 7. Delivery in SIF of α -amylase, lipase or trypsin formulated individually with (a) CM-HAS or (b) S-HAS. The tablets (200 mg) formulated with 10 mg α -amylase, 20 mg lipase or 10 mg trypsin were first incubated 1 h in SGF containing pepsin and then transferred in 50 mL of 50 mM PB (pH 7.2) at 37°C and 50 rpm, withdrawing samples at various intervals to determine their enzymatic activities (n = 4).

Fig. 8. Delivery in SIF of α -amylase, lipase and trypsin formulated together with (a) CM-HAS or (b) S-HAS. The tablets (200 mg) formulated with 15 mg α -amylase, 15 mg lipase and 15 mg trypsin were incubated (37°C and 50 rpm) for 1 h in 50 mL of SGF containing pepsin and then transferred in 50 mL of 50 mM PB (pH 7.2) at 37°C and 50 rpm, withdrawing samples at various intervals to determine their enzymatic activities (n = 4).

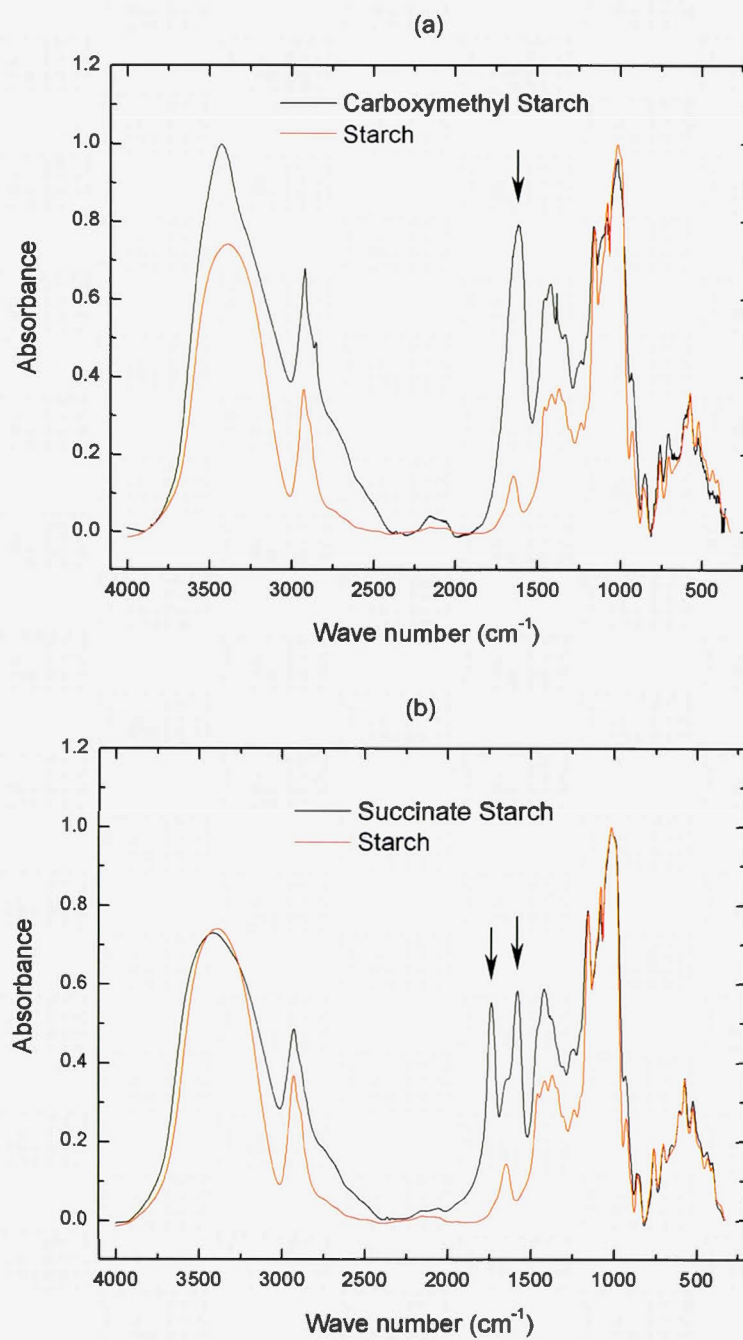
Fig. 9. Delivery in SIF of bi-enzymatic formulations with (a) CM-HAS or (b) S-HAS. The tablets (200 mg) formulated with (1) 15 mg α -amylase and 15 mg lipase, or

(2) 15 mg α -amylase and 15 mg trypsin, or (3) 15 mg lipase and 15 mg trypsin, were incubated (37°C and 50 rpm) for 1 h in 50 mL of SGF containing pepsin and then transferred in 50 mL of 50 mM PB (pH 7.2) at 37°C and 50 rpm, withdrawing samples at various intervals to determine their enzymatic activities (n = 4).

Fig. 10. Tablet loading of α -amylase, lipase or trypsin formulated with (a) CM-HAS or (b) S-HAS. The tablets (200 mg) formulated with increasing percentages of α -amylase (n = 2), lipase (n = 3) or trypsin (n = 2) were incubated (37°C and 50 rpm) for 1 h in 50 mL of SGF containing pepsin and then transferred in SIF, crushed and enzymes activities measured and expressed in (1) total enzyme units and (2) percentage of total enzyme units recovered.



Scheme 1

**Fig. 1**

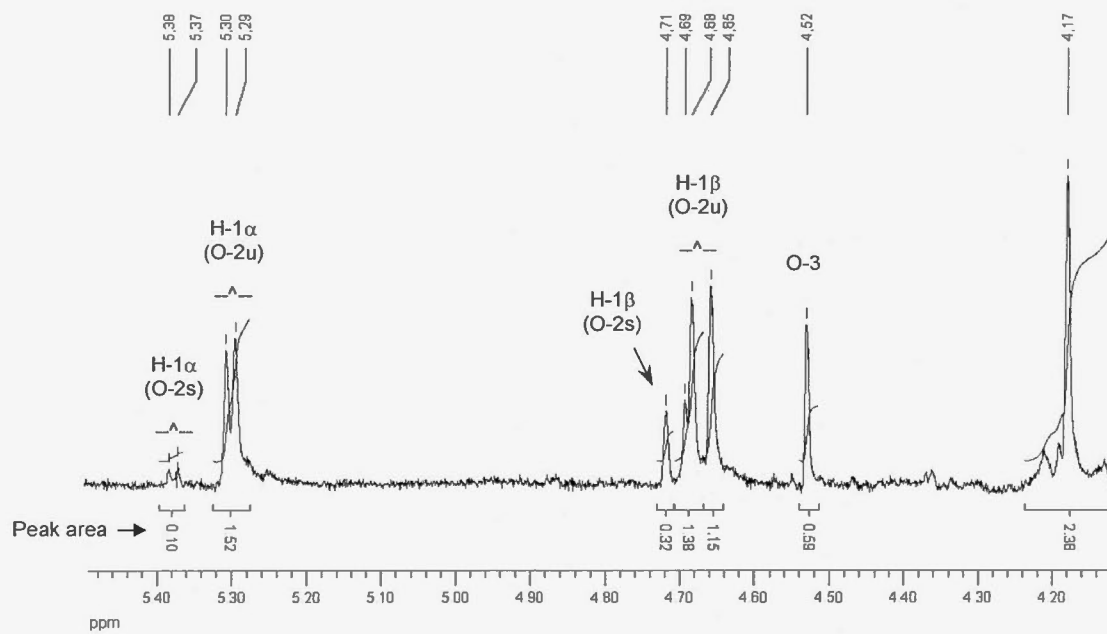
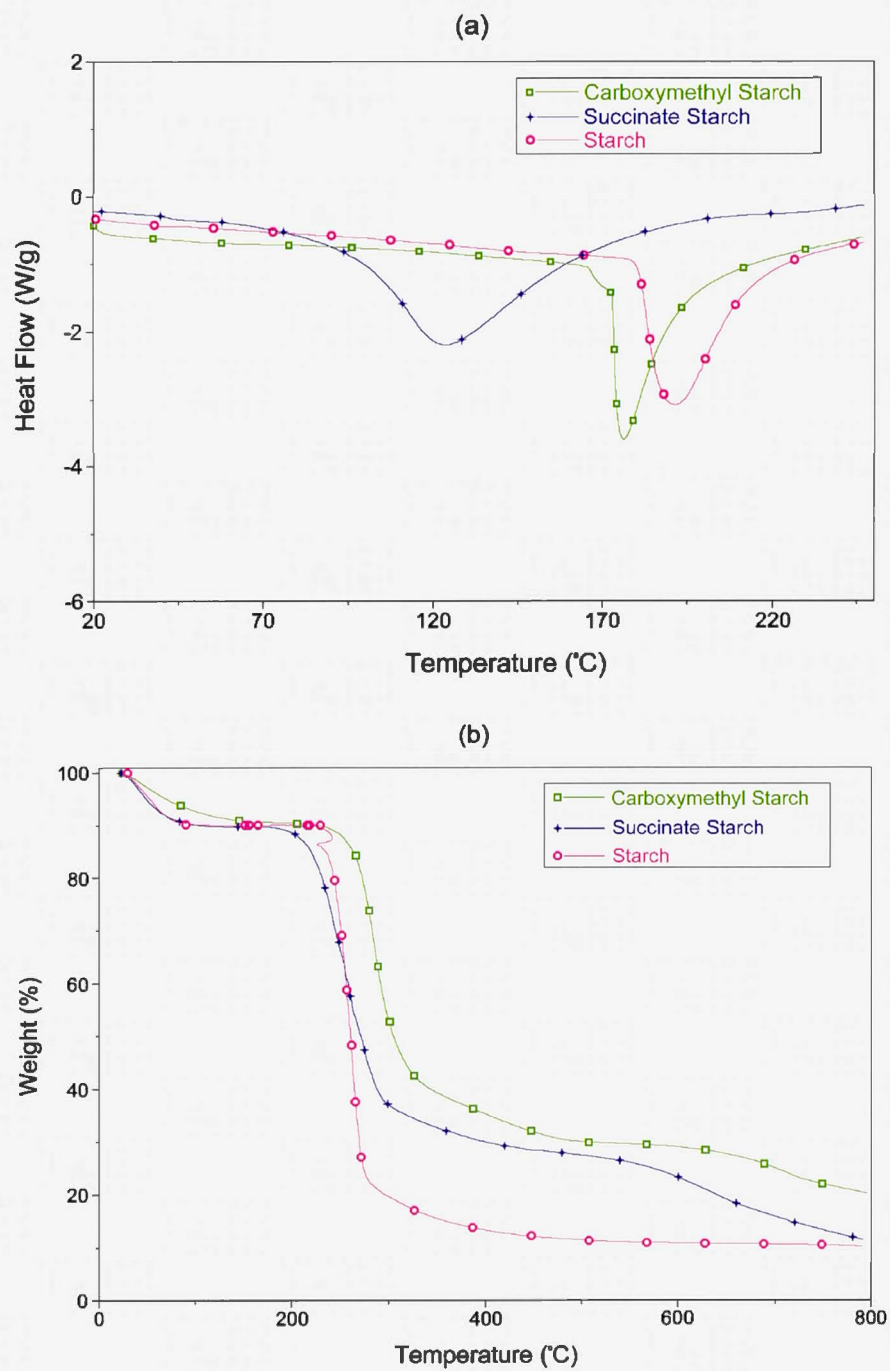
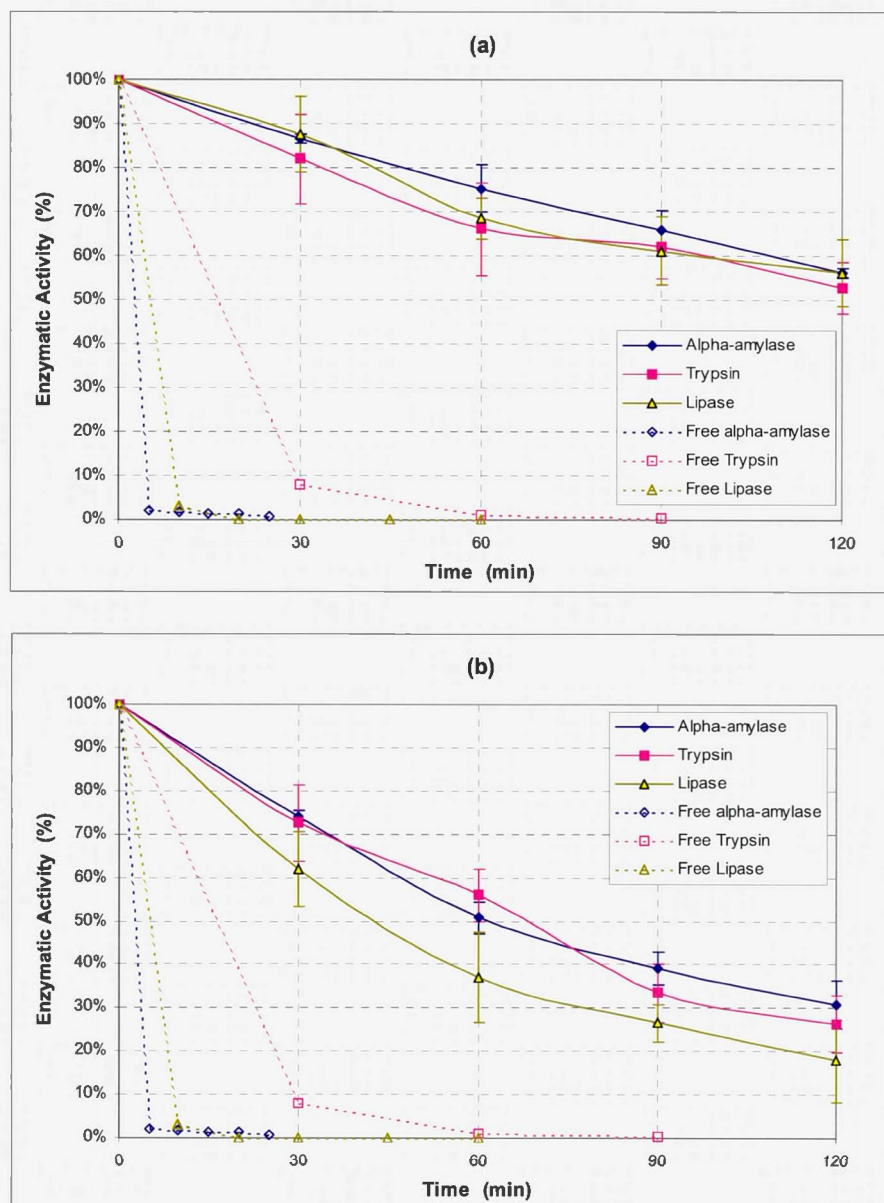
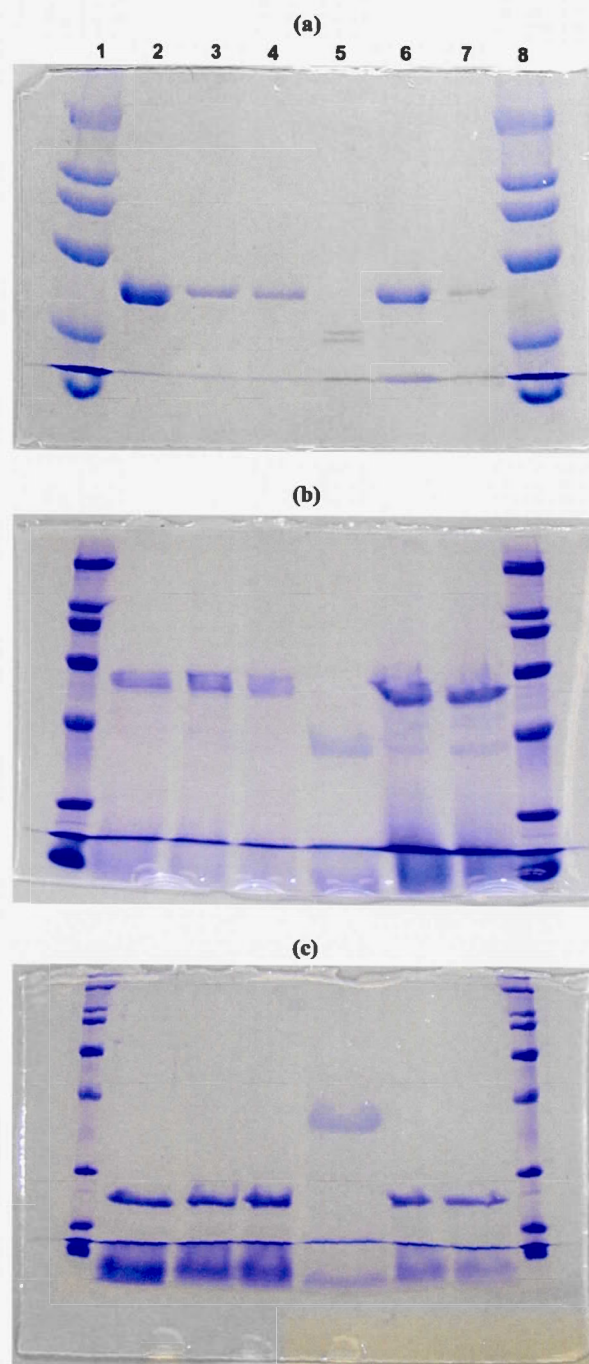
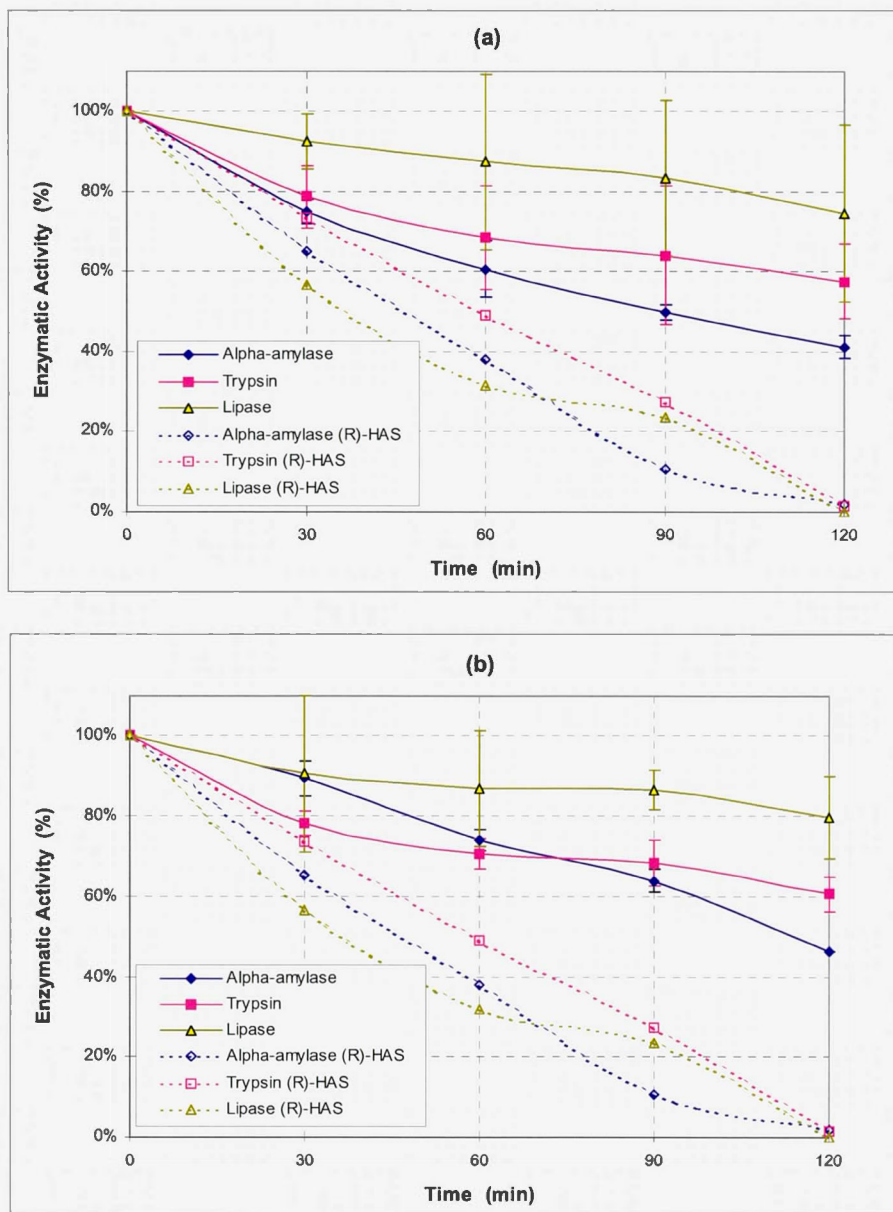


Fig. 2

**Fig. 3**

**Fig. 4**

**Fig. 5**

**Fig. 6**

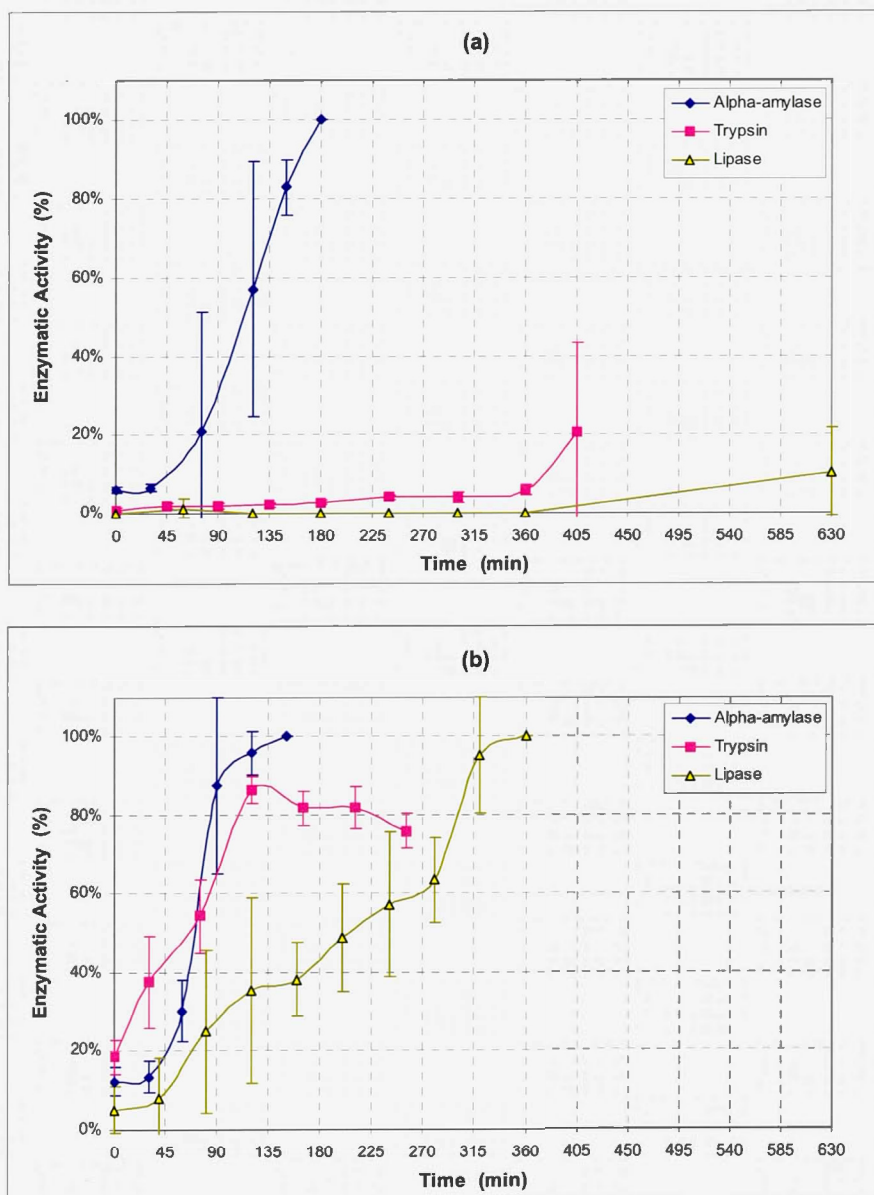
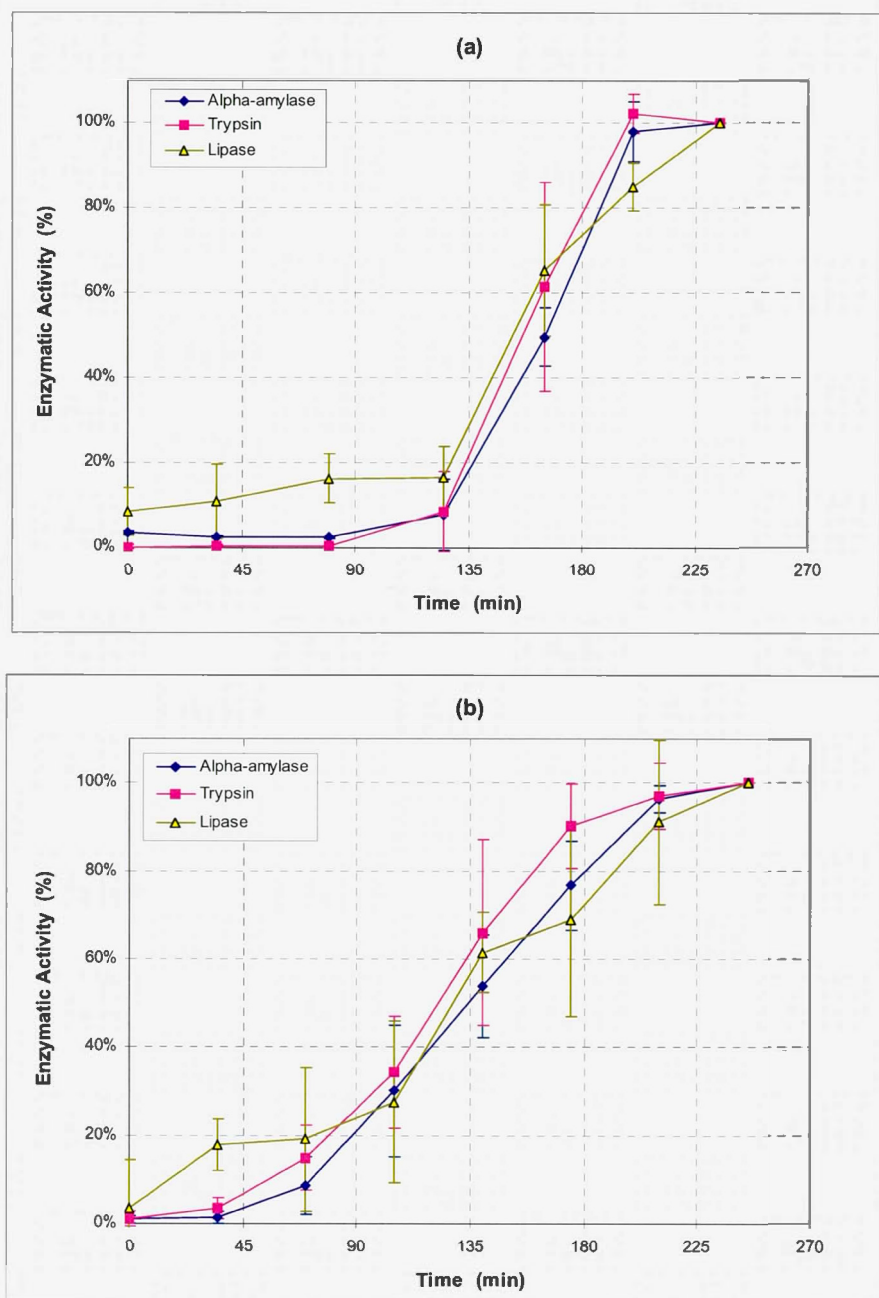


Fig. 7

**Fig. 8**

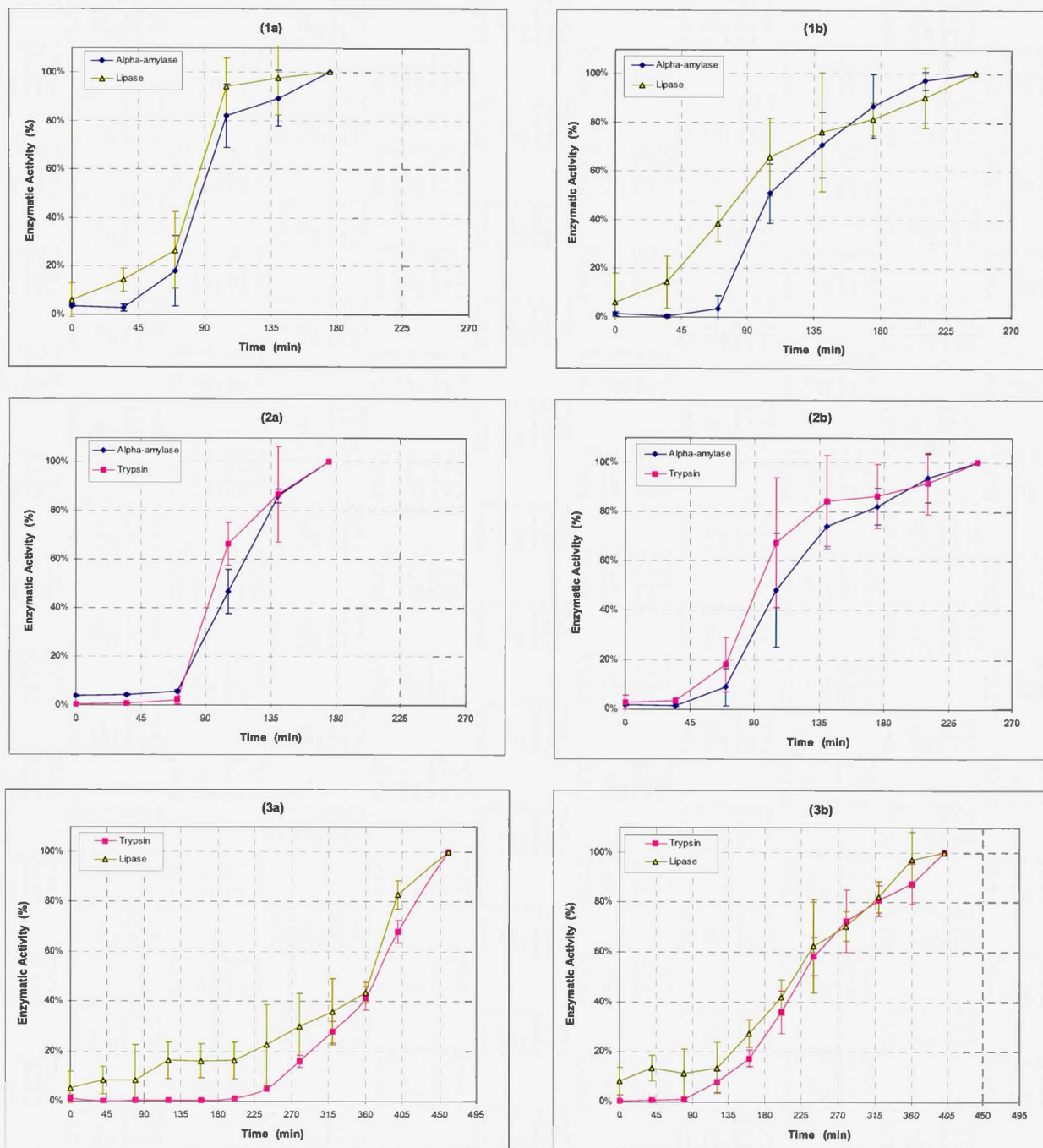


Fig. 9

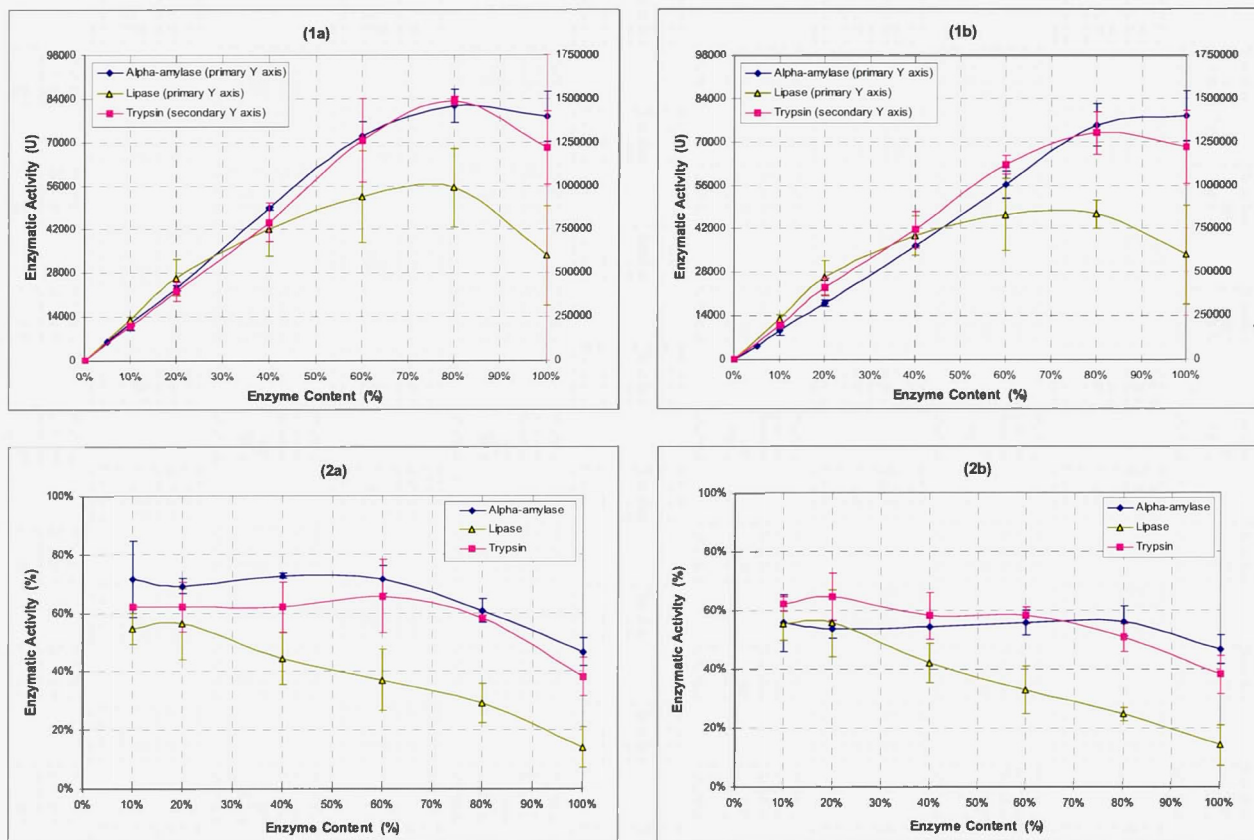


Fig. 10

CHAPITRE V

CONCLUSION

Les dérivés d'amidon riche en amylose basés sur l'ajout de groupements carboxyles de type carboxyméthyle et succinyle, sont proposés comme excipients pharmaceutiques pour l'administration orale d'enzymes pancréatiques de remplacement. Deux volets ont été étudiés. Le premier portant sur i) leurs utilisations comme matrices pour protéger les enzymes face à la dénaturation gastrique, ii) leurs capacités à libérer le principe actif au niveau de l'intestin et iii) leurs capacités de chargement en enzyme. Le deuxième portant sur leurs propriétés physico-chimiques [analyses par spectroscopie d'absorption atomique (AAS), par infrarouge (FTIR), par résonance magnétique nucléaire (RMN), par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et par analyse thermogravimétrique (TGA)].

La protection des enzymes lors du passage gastrique:

Les dérivés CM-ARA (DS 5,1 %) et S-ARA (DS 5,6 %) offrent une protection notable aux enzymes pancréatiques contre la dénaturation gastrique sur une période de 2 h comparativement aux enzymes libres qui sont pratiquement dénaturées en 5-30 min. Les enzymes étudiées (α -amylase, lipase et trypsine) lorsque formulées individuellement avec l'excipient, le CM-ARA préserve après 1 h, 75 %, 69 % et 66 % de leurs activités enzymatiques, respectivement. Lorsque l'excipient utilisé est le S-ARA, les valeurs sont de 51 %, 56 % et 37 % pour ces mêmes enzymes (dans l'ordre).

Pour les formulations trienzymatiques, lorsque formulées ensemble avec l'excipient, la moyenne des activités résiduelles est de 72 % pour les formulations avec

le CM-ARA et de 77 % pour celles avec le S-ARA après incubation d'une heure dans le SGF. Lorsqu'on utilise un CM-ARA avec un DS plus faible (3,3 %), l'activité enzymatique moyenne des trois enzymes formulées ensemble avec l'excipient augmente à 76 %. Par ailleurs, lorsque l'on augmente le DS du S-ARA (6,6 %), l'activité enzymatique moyenne augmente à 85 %.

Libération des enzymes après le passage gastrique:

Les études sur le relargage de ces mêmes enzymes en un milieu SIF et après une incubation dans le SGF, ont montré que lorsque formulées individuellement avec la matrice, le CM-ARA libère 75 % de l'activité totale restante de l' α -amylase en 140 min. Il y a peu de lipase et de trypsine libérées même après 7 h d'incubation; les comprimés restent intacts et ils ne relarguent donc pas les deux enzymes. Ce comportement suggère la présence d'interactions entre la matrice carboxyméthylée et la lipase ainsi qu'entre la matrice et la trypsine. Le S-ARA libère 75 % de l'activité enzymatique totale restante après 84, 295 et 90 min pour l' α -amylase, la lipase et la trypsine, respectivement.

Lorsque les trois enzymes sont formulées ensemble, les comprimés avec l'excipient CM-ARA et ceux avec le S-ARA, libèrent 75 % de l'activité enzymatique totale restante (une partie des enzymes est dénaturée après l'incubation dans le SGF) après 180 min et 170 min, respectivement. Lorsqu'on utilise un CM-ARA avec un DS plus faible (3,3 %), la libération de 75 % de l'activité enzymatique restante prend 118 min. Cependant, lorsque l'on augmente le DS du S-ARA (6,6 %), la libération prend 155 min.

Capacité de chargement:

L'activité enzymatique libérée augmente avec la charge en enzyme jusqu'à 70-80 % dans les formulations avec les deux excipients. Plus précisément, la capacité de chargement des matrices (S-ARA et CM-ARA) est linéaire jusqu'à 40 % pour l' α -amylase et jusqu'à 20 % pour la lipase. Pour la trypsine, les formulations avec le

CM-ARA montre une capacité de chargement linéaire jusqu'à 80 % d'actif tandis que cette capacité est linéaire jusqu'à 60 % pour celles avec le S-ARA.

De façon générale, les valeurs de protection contre l'acidité gastrique sont similaires entre les formulations avec le CM-ARA et le S-ARA bien que celles avec le S-ARA ont montré une meilleure protection des trois enzymes formulées ensemble. Le CM-ARA offre cependant une meilleure protection des enzymes formulées individuellement. En ce qui concerne la capacité de chargement, une grande teneur en élément actif pour une masse réduite du comprimé représente une qualité désirable pour une formulation pharmaceutique. Un autre avantage de cette formulation est que la protection gastrique est fournie par les matrices carboxylées, sans enrobage entérique. Somme toute, la réalisation de matrices permettant la formulation avec des enzymes pancréatiques et qui peuvent être administrées par voie orale, est très prometteuse pour le traitement de la pancréatite.

Aspects structuraux:

Les spectres FTIR montrent la présence d'un pic d'absorption à 1618 cm^{-1} correspondant à un carboxylate (sodium) pour le CM-ARA. Pour le S-ARA, deux nouveaux pics d'absorption sont présents: un à 1738 cm^{-1} correspondant à un ester et un autre à 1580 cm^{-1} correspondant au carboxylate.

Les analyses par DSC de l'ARA, du CM-ARA et du S-ARA ont montré que le changement en enthalpie obtenue pour le S-ARA est 1,7 fois supérieur à celui de l'ARA, tandis que des valeurs similaires ont été obtenues pour l'ARA et le CM-ARA, suggérant une présence des domaines cristallins du S-ARA plus importante que celle pour le CM-ARA. Cependant, les températures de fusion obtenues montrent que les domaines cristallins de l'ARA sont plus étendus que ceux du CM-ARA et du S-ARA.

Les profils des analyses par TGA montrent que la stabilité thermique du CM-ARA est plus élevée que celui de l'ARA tandis que le S-ARA a une stabilité moins élevée. Cet effet opposé entre le CM-ARA et le S-ARA peut être expliqué par la nature de la substitution ainsi que par la nature des groupements fonctionnels.

Perspectives:

Une étude plus approfondie serait nécessaire pour déterminer avec plus de précision les effets de la variation du DS ainsi que leurs répercussions dans certaines propriétés des enzymes formulées avec ces matrices. Il serait aussi intéressant de faire l'étude de la structure du S-HAS par résonance magnétique nucléaire (600 MHz) afin de montrer sur quel hydroxyle se fait la substitution ainsi que les ratios obtenus. Néanmoins, la réalisation de formulations d'enzymes pancréatiques pouvant être administrées par voie orale est très prometteuse et les matrices proposées présentent un intérêt pour les industries pharmaceutiques impliquées dans les systèmes pour le relargage de principes actifs au niveau de l'intestin. Une étude *in vivo* avec des formulations obtenues pourrait représenter une étape importante pour des futures phases cliniques pour applications chez des sujets humains.

ANNEXES

Carboxymethyl High Amylose Starch as Excipient Affording Resistance to Gastric Acidity for Bioactive Agents Oral Formulations

Carmen Calinescu, Louis-Philippe Massicotte, Jérôme Mulhbachter and Mircea-Alexandru Mateescu
Department of Chemistry and Biochemistry, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8
mateescu.m-alexandru@uqam.ca

ABSTRACT SUMMARY

The active agents (*Lactobacillus rhamnosus*, α -amylase) formulated as tablets with Carboxymethyl High Amylose Starch (CM-HAS) displayed higher stability after incubation in simulated gastric conditions (pH 1.2, pepsin) than the non-protected agents. Thus, CM-HAS appears to be an interesting excipient for bioactive agents transportation through the gastro-intestinal tract and gut delivery.

INTRODUCTION

Lactobacilli are Gram-positive lactic acid-producing bacteria that constitute a major part of the intestinal microflora in animals and humans. Lactic acid bacteria can be denatured by different factors such as the acidic medium and bile acids. Thus, oral formulations based on polymers have to protect the active agents (bacteria, enzymes) from the acidic/enzymatic gastric fluid and to deliver it to the intestinal mucosal site.

Polymeric carboxylated CM-HAS carriers are expected to change the cation for a proton in acidic (gastric) medium, resulting in a compact structure [1]. This ensures local (limited to surface surroundings) buffering properties and thus protects the active agent against acidic denaturation. When in neutral or weak alkaline media, the protonated form will change the proton for cations, facilitating hydration and swelling, and generating polymeric material dissolution, with release of the bioactive agent.

In this *in vitro* study, live *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) bacteria or α -amylase were directly incorporated in CM-HAS. The aims of the study were to evaluate whether CM-HAS can ensure the protection of the bioactive agents against acidic/enzymatic denaturation and their liberation in simulated intestinal fluids (SIF).

EXPERIMENTAL

Synthesis of polymeric derivatives (CM-HAS)

The derivatives were synthesized as described previously by Calinescu et al. [1]. The degree of substitution was determined by potentiometric titration of CM groups with 0.2 N NaOH solution and was expressed in mEquivalents of functional groups/g of polymeric powder (mEquiv/g).

Stability of α -amylase and *L. rhamnosus* bacteria formulated with CM-HAS in simulated gastric fluid (SGF)

Tablets (200 mg), based on CM-HAS and containing 10 mg of lyophilized *L. rhamnosus*

(approximately 10^9 bacteria) or 10 mg of α -amylase from *Bacillus species* (2560 units/mg protein), were formulated by direct compression at 2.5 T/cm². Tablets were placed individually in 50 mL of sterile SGF pH 1.2 [2] for different times at 37 °C (simulating the gastric passage), under agitation at 50 rpm. The viability of bacteria or the enzyme activity was evaluated after 60 and 120 min in SGF containing pepsin. After the appropriate period of incubation in SGF, the tablets were transferred into 50 mL of sterile PBS (pH 7.4), and then crushed.

The *L. rhamnosus* viability was determined by counting the number of CFU (colony forming units). For α -amylase activity, the reductimetric method of Noelting and Bernfeld [3] based on the DNS (dinitro salicylate reagent) was used.

Loading capacity of CM-HAS with α -amylase active agent

Tablets (200 mg), based on CM-HAS and containing 10, 40, 80, 120 and 160 mg of α -amylase were formulated by direct compression at 3.0 T/cm². Tablets were placed individually in 50 mL of SGF pH 1.2 containing pepsin, for one hour at 37 °C under agitation at 50 rpm, using an incubator shaker. After the appropriate incubation period in SGF, the amylolytic activity was determined by the method of Noelting and Bernfeld as above.

L. rhamnosus and α -amylase delivery in the simulated intestinal medium

Tablets (200 mg), based on CM-HAS and containing 10 mg of lyophilized *L. rhamnosus* or 10 mg of α -amylase, were formulated by direct compression at 2.5 T/cm². Tablets were placed individually in 50 mL of sterile SGF pH 1.2 for 1h and then transfer in SIF containing pancreatin [2] (*L. rhamnosus*) or in PBS solution, pH 7.2 (α -amylase) for 8h at 37 °C (50 rpm). Samples of 1 mL were taken after 1h in SGF and every hour in the SIF/PBS. The *L. rhamnosus* CFU number or the α -amylase activity was determined on each sample.

RESULTS AND DISCUSSION

Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS), with a substitution degree between 0.6-1.0 mEquiv. of CM-groups/g polymer was previously introduced as excipient for oral tablet formulation of bioactive agents.

The *L. rhamnosus* viability tests showed that the polymeric excipient was able to protect the bacteria against 120 min of acidic denaturation (Fig. 1a) when formulated as tablets. For the free *L.*

rhamnosus suspension, no viable bacteria were observed after 1 and 2h of incubation in acidic medium (pH 1.2). This assay also showed that non-formulated bacteria can not persist in SGF (pH 1.2) for 60 min or longer whereas the CM-HAS can protect the bacteria in SGF medium for 2h.

The enzymatic assays showed that, when formulated with CM-HAS, the polymeric excipient was able to afford a considerable protection to the α -amylase enzyme against acidic denaturation for 2 h, whereas the free enzyme was totally inactivated (Fig. 1b). After 120 min, the enzyme formulated with CM-HAS conserved 56% of her initial activity, whereas for the free, unprotected α -amylase, no activity at all was observed after 1h in SGF (pH 1.2).

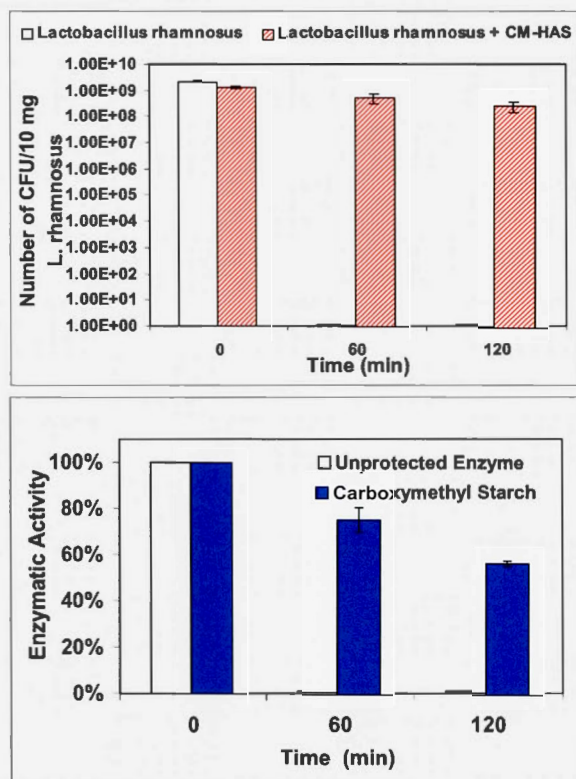


Fig. 1. Stability of *L. rhamnosus* bacteria (a) and α -amylase (b) formulated with CM-HAS in simulated gastric fluid (n=3)

It was found that tablets were in good shape and the α -amylase activity preserved after 1h incubation in SGF, even when loaded with 80 % active agent (Fig. 2). This aspect is important for the further development, showing a high loading capacity of these pharmaceutical formulations.

The release of the bacteria or enzyme was clearly related to tablet swelling and dependent on the substitution degree.

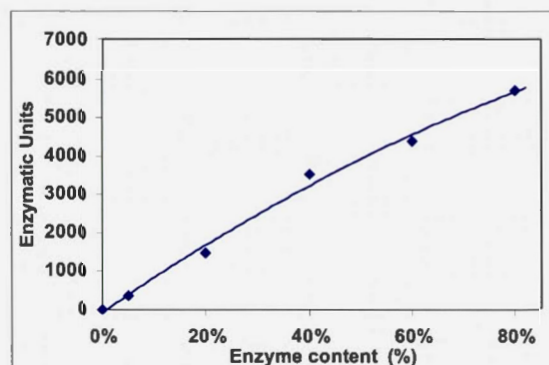


Fig. 2. Liberation of α -amylase formulated with CM-HAS in PBS solution (pH 7.2).

For the liberation of α -amylase, practically no enzymatic activities were detected after 1h of liberation in SGF. An α -amylase liberation from CM-HAS tablets was observed after 1h in phosphate buffer and the maximum of activity in the medium was reached after 2h of release in phosphate buffer (data not shown).

No viable bacteria were liberated after 1h in SGF nor in the first hour in SIF. The gel forming around the tablet, which may generate a delayed liberation, could explain this lack of bacterial or enzyme release. A bacterial liberation from CM-HAS tablets was observed after 2h in SIF. This liberation seems related to the swelling and erosion of the polymeric matrix (data not shown).

CONCLUSION

The data presented on a Gram positive *Lactobacillus rhamnosus* are in good agreement with those obtained with the Gram negative *Escherichia coli*. The CM-HAS also allows the formulation of enzymes (here α -amylase, a therapeutic enzyme orally administered). CM-HAS appears to be an interesting excipient for protecting bioactive agents from the gastric degradation and allowing their delivery in the gut, opening interesting perspectives for oral therapeutic formulations.

REFERENCES

- [1] C. Calinescu, J. Mulbacher, É. Nadeau, J. M. Fairbrother, M. A. Mateescu, Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations, Eur. J. Pharm. Biopharm. (2005) *In press*.
- [2] U. S. Pharmacopeia National Formulary U.S.P. XXIV, NF XIX, United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD, 2000.
- [3] G. Noelting, P. Bernfeld, Diastatic enzymes. III. β amylase: determination of activity and control of absence of α -amylase. Helv. Chim. Acta. 31 (1948) 286-290.

Carboxymethyl High Amylose Starch as Excipient Affording Resistance to Gastric Acidity for Bioactive Agents Oral Formulations

UQÀM
Université du Québec à Montréal

Carmen Calinescu, Louis-Philippe Massicotte, Jérôme Mulhbachter and Mircea-Alexandru Mateescu
Department of Chemistry and Biochemistry & Centre BioMed, Université du Québec à Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. A, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada



ABSTRACT

Carboxymethyl High Amylose Starch (CM-HAS) is proposed as excipient for oral tablet formulation of bioactive agents. The active agents (*Lactobacillus rhamnosus*, α -amylase) formulated as tablets with CM-HAS displayed higher stability after incubation in simulated gastric conditions (pH 1.2, pepsin) than the non-protected agents. Thus, CM-HAS appears to be an interesting excipient for bioactive agents transportation through the gastro-intestinal tract and gut delivery.

INTRODUCTION

Lactobacilli are Gram-positive lactic acid-producing bacteria that constitute a major part of the intestinal microflora in animals and humans. Lactic acid bacteria can be denatured by different factors such as the acidic medium and bile acids. There is a need for oral formulations based on polymers able to protect the active agents (bacteria, enzymes) from the acidic/enzymatic gastric fluid and to deliver them to the intestinal site.

Polymeric carboxylated CM-HAS carriers are expected to change the cation for a proton in acidic (gastric) medium, resulting in a compact structure [1]. This ensures local (surface surroundings) buffering properties and thus protects the active agent against acidic denaturation. When in neutral or weak alkaline media, the protonated form will change the proton for cations, facilitating hydration and swelling, and generating polymeric material dissolution, with release of the bioactive agent.

In this *in vitro* study, live *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) bacteria or α -amylase were directly incorporated in CM-HAS tablets. The aims of the study were to evaluate whether CM-HAS can ensure the protection of the bioactive agents against acid/enzymatic denaturation and their liberation in simulated intestinal fluids (SIF).

EXPERIMENTAL

Synthesis of polymeric derivatives (CM-HAS)

The derivatives were synthesized as described previously by Calinescu et al. [1]. The degree of substitution was determined by potentiometric titration of CM groups with 0.2 N NaOH solution and was expressed in mEquivalents of functional groups/g of polymeric powder (mEq/g).

Stability of α -amylase and *L. rhamnosus* bacteria formulated with CM-HAS in simulated gastric fluid (SGF)

Tablets (200 mg), based on CM-HAS and containing 10 mg of lyophilized *L. rhamnosus* (approximately 10^8 bacteria) or 10 mg of α -amylase from *Bacillus species* (2560 unit/mg protein), were formulated by direct compression at 2.5 T/cm². Tablets were placed individually in 50 mL of sterile SGF pH 1.2 [2] for different times at 37 °C, under agitation at 50 rpm. The viability of bacteria or the enzyme activity was evaluated after 60 and 120 min in SGF containing pepsin.

After the appropriate period of incubation in SGF, the tablets were transferred into 50 mL of sterile PBS (pH 7.4), and then crushed.

The *L. rhamnosus* viability was determined by counting the number of colony forming units (CFU). For α -amylase activity, the redimetric method of Noelling and Bernfield based on the diniro salicylate reagent (DNS) was used.

Loading capacity of CM-HAS with α -amylase active agent
Tablets (200 mg), based on CM-HAS and containing 10, 40, 80, 120 and 160 mg of α -amylase were formulated by direct compression at 3.0 T/cm². Tablets were placed individually in 50 mL of SGF pH 1.2 containing pepsin, for 1h at 37 °C under agitation at 50 rpm, using an incubator shaker. After the appropriate incubation period in SGF, the amylolytic activity was determined by the method of Noelling and Bernfield as above.

***L. rhamnosus* and α -amylase delivery in the simulated intestinal medium**

Tablets (200 mg), based on CM-HAS and containing 10 mg of lyophilized *L. rhamnosus* or 10 mg of α -amylase, were formulated by direct compression at 2.5 T/cm². Tablets were placed individually in 50 mL of sterile SGF pH 1.2 for 1h and then transferred in SIF containing pancreatin [2] (*L. rhamnosus*) or in PBS solution, pH 7.2 (α -amylase) for 8h at 37 °C (50 rpm). Samples of 1 mL were taken after 1h in SGF and every hour in the SIF/PBS. The *L. rhamnosus* CFU number or the α -amylase activity was determined for each sample.

RESULTS

Table 1. The CM-HAS substitution degree

| Polymer | Degree of substitution (mEquivalents of functional groups / g of polymeric powder) |
|---------|--|
| CM-HAS | 0.8 – 1.0 |

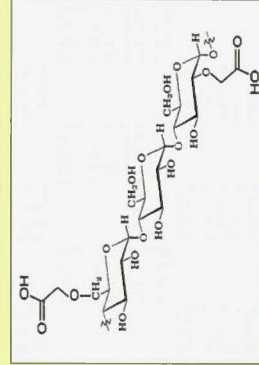


Fig.1 Carboxymethyl High Amylose Starch (CM-HAS) structure

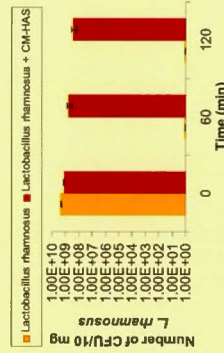


Fig.2 Stability of *L. rhamnosus* bacteria formulated with CM-HAS in SGF

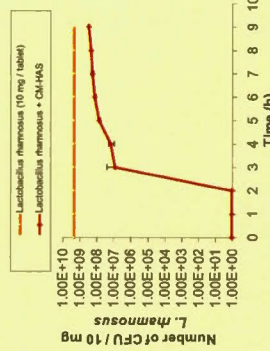


Fig.3 Release of alive bacteria formulated in tablets with CM-HAS in SIF

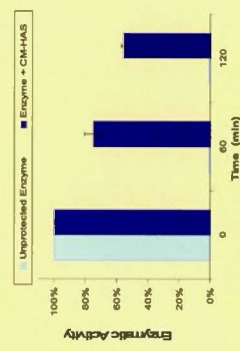


Fig.4 Stability of α -amylase formulated with CM-HAS in SGF

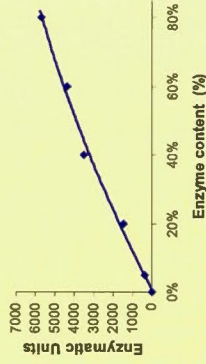


Fig. 5 Liberation of α -amylase formulated with CM-HAS in PBS medium (pH 7.2)

CONCLUSIONS

- the polymeric excipient was able to protect bacteria against 120 min of acidic denaturation when formulated as tablets. For the free *L. rhamnosus* suspension, no viable bacteria were observed after 1h and 2h of incubation in acidic medium (pH 1.2).
- no viable bacteria were liberated after 1h in SGF nor in the first hour in SIF, probably due to a gel forming around the tablet, which may delay the liberation. Bacterial release from CM-HAS tablets was observed after 2h in SIF.
- after 120 min (SGF), the enzyme formulated with CM-HAS conserved 56% of her initial activity, whereas for the free, unprotected α -amylase, no activity at all was observed after 1h in SGF (pH 1.2).
- the α -amylase activity was preserved after 1h incubation in SGF, even when loaded with 80 % active agent.
- CM-HAS appears as an interesting excipient for protecting bioactive agents from the gastric degradation and allowing their delivery in the gut, opening interesting perspectives for oral therapeutic formulations.

REFERENCES

- [1] C. Calinescu, J. Mulhbachter, É. Nadeau, J. M. Fairbrother, M. A. Mateescu, Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations, Eur. J. Pharm. Biopharm. 60 (2005) 53-60.
- [2] US Pharmacopeia National Formulary XXIV, NF XXIV, 2000.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to Geation Valeo for financial support and to Harmonium International for kindly supplying bacteria.

Formulations pharmaceutiques à base d'amidon modifié

Louis-Philippe Massicotte, Jérôme Mulhbachter, Carmen Calinescu, Mircea Alexandru
Mateescu

Département de Chimie, Centre BioMed, Université du Québec à Montréal
Montréal (Québec), H3C 3P8, Canada

L'amidon caboxyméthylé (CM-S) et l'amidon succinylé (S-S) peuvent être utilisés comme excipients pharmaceutiques pour la formulation d'agents bioactifs à administration orale en assurant leur transport à travers le milieu gastro-intestinal simulé (SGF). Les excipients étudiés: le CM-S et le S-S, présentaient, les deux, un degré de substitution de 1,0 méq/g. Les comprimés ont été obtenus par compression des poudres de l'excipient et une des enzymes digestives étudiées: l' α -amylase et la trypsine. Il a été montré que les deux excipients protègent l' α -amylase et la trypsine à travers un milieu simulant l'acidité gastrique, ce qui ouvre des perspectives intéressantes pour des formulations pharmaceutiques. Les enzymes libres présentaient des activités négligeables après 30 minutes dans le milieu SGF tandis que les enzymes formulées possédaient 75 - 90% de leurs activités initiales. Après deux heures de passage dans le milieu gastrique, les activités rémanentes étaient de 40 - 60% de leurs activités de départ. Ces résultats montrent le rôle protecteur des excipients face à la dénaturation en milieu acide. La libération des enzymes avait lieu en milieu neutre (intestinal) et celles-ci étaient libérées à différent temps selon le type d'excipient utilisé. En ce qui a trait à la capacité de charge des comprimés en élément actif, les composés contenant de l' α -amylase ont tous gardé leur intégrité pour plus d'une heure en milieu acide (SGF) même pour ceux contenant 80% d'actif. Une grande capacité de charge en élément actif est une qualité désirable pour un excipient pour assurer un fort potentiel thérapeutique pour une masse réduite de forme solide de dosage.

FORMULATIONS PHARMACEUTIQUES À BASE D'AMIDON MODIFIÉ

L-P. Massicotte, M.A. Mateescu

Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Montréal (Québec), H3C 3P8, Canada

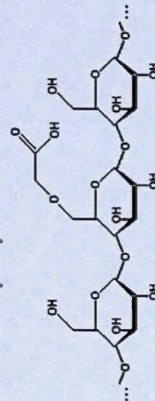
Introduction

L'amidon est un ingrédient très versatile et utilisé dans plusieurs applications alimentaires et industrielles. Sous forme native ou modifiée par substitution ou modifications physiques, l'amidon est employé comme agent gélifiant, épaississant, adhésif et pour retenir l'humidité. Le granule d'amidon est partiellement cristallin et est composé d'amylose et d'amylopectine.

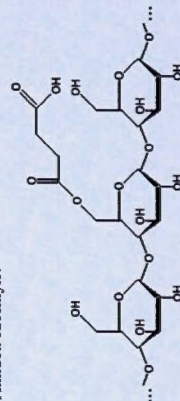
L'amylose est un polymère non ramifié contenant jusqu'à 6000 unités d'anhydroglucose liées par des liaisons α 1,4-D-glucosidiques. En contraste, l'amylopectine a une masse moléculaire approximativement 1000 fois plus élevée que celle de l'amylose et comprend de nombreux polyglucosides branchés par des liens α 1,6-D-glucosidiques.

Le Hylon VII (*High Amylose Starch*) est composé de 70% (ou plus) d'amylose. La teneur plus élevée en amylose, par rapport à l'amidon, permet de plus grandes possibilités de modification chimiques, physiques et de ses propriétés.

Amidon carboxyméthylé:



Amidon succinylé:



Partie Expérimentale

La synthèse de l'amidon modifié: 70 g de Hylon VII ont été dissouts dans 171 mL d'eau avant d'être amenés à 50 °C sous agitation constante et 13,7 g de NaOH dissouts dans 235 mL H₂O ont été ajoutés au mélange sous agitation pendant 70 min pour la gélatinisation.

Pour la synthèse de l'amidon succinylé: le pH a été ajusté à 8,0 avec de l'acide acétique et le volume du mélange refroidi a été complété à 1,5 L avec de l'H₂O. Une quantité de 16 g d'anhydride succinique solide a été ajoutée au mélange tout en gardant le pH entre 8,0 et 8,4. Après la stabilisation du pH, le mélange a été laissé réagir sous agitation pendant 10 min.

Pour la synthèse de l'amidon carboxyméthylé: 55 mL de NaOH 10 M et 45,5 g d'acide monochloroacétique (MCA) ont été ajoutés au milieu réactionnel et maintenu sous agitation 1 h suivi par neutralisation à la température de la pièce.

Le séchage a été fait à l'acétone et la poudre a été récupérée par filtration. Des comprimés (diamètre de 9 mm et épaisseur de 2 mm) de 200 mg ont été obtenus par compression à 3,0 T/cm² à partir des poudres des excipients et des agents bioactifs correspondants.

La détermination de l'activité de l' α -amylase a été effectuée par la méthode réductométrique de Noeling et Bernfeld, en utilisant l'acide dinitrosalicylique (DNS), tandis que la détermination de l'activité de la trypsine a été faite selon Bergmeyer et al. en utilisant une solution de N α -Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester (BAEE).

Résultats

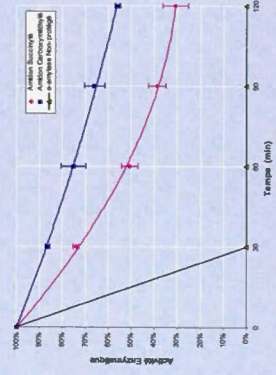


Fig.1: Détermination de l'activité enzymatique libérée à partir de comprimés à base d'amidon carboxyméthylé ou succinylé contenant 10 mg d' α -amylase, après différents temps d'incubation dans une solution acide simulant le fluide gastrique (SGF).

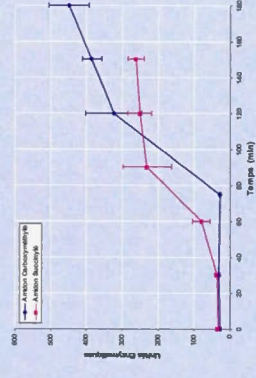


Fig.2: Détermination de l'activité de l' α -amylase libérée par des comprimés à base d'amidon carboxyméthylé ou succinylé, contenant 10 mg d'enzyme, dans un tampon Na₂HPO₄ - NaH₂PO₄ (pH 7,2, 50 mM) après 1 h d'incubation dans le SGF.

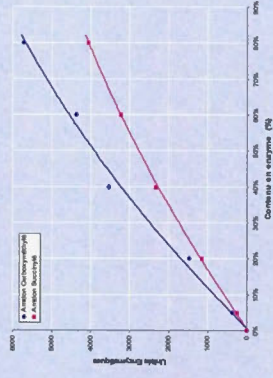


Fig.3: Détermination de l'activité enzymatique en fonction de la capacité de charge en α -amylase dans des comprimés à base d'amidon carboxyméthylé ou succinylé après 1 h d'incubation dans le SGF.

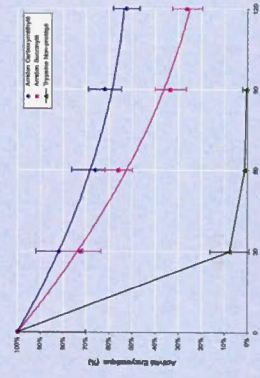


Fig.4: Détermination de l'activité enzymatique libérée à partir de comprimés à base d'amidon carboxyméthylé ou succinylé, contenant 10 mg de trypsine, après différents temps d'incubation dans le SGF.

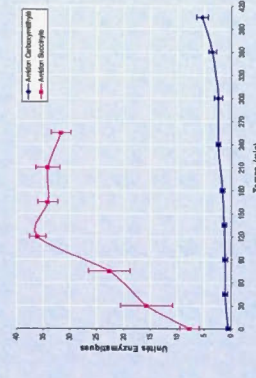


Fig.5: Détermination de l'activité de la trypsine libérée par des comprimés à base d'amidon carboxyméthylé ou succinylé, contenant 10 mg de trypsine, dans un tampon Na₂HPO₄ - NaH₂PO₄ (pH 7,2, 50 mM) après 1 h d'incubation dans le SGF.

Conclusion

Résistance en milieu acide: L'amidon carboxyméthylé et l'amidon succinylé donnent une protection notable contre la dénaturation de α -amylase et de la trypsine, même après 120 min en milieu acide.

Libération en milieu neutre: Le relargage de l' α -amylase des comprimés d'amidon succinylé débute après 30 min d'incubation dans un tampon phosphate (pH 7,2, 50 mM) pour atteindre une libération quasi complète après 90 min. Pour les comprimés d'amidon carboxyméthylé, la libération commence après 75 min et atteint son maximum après 3 h. Le relargage de la trypsine, même après 6 h, est négligeable pour les comprimés d'amidon carboxyméthylé. D'autre part, pour les comprimés d'amidon succinylé, l'activité trypsinolytique a été détectée dès le moment du transfert des comprimés et la trypsine a été complètement libérée en 2 h.

Capacité de chargement: Les comprimés contenant de l' α -amylase ont tous gardé leur intégrité pour une durée de 1 h en milieu SGF, même pour ceux contenant 80% d'élément actif. Une grande teneur en élément actif pour une masse réduite du comprimé représente une qualité désirable pour un excipient pharmaceutique.

Remerciements

Valco pour le financement du projet
Jérôme Mulhauser et Carmen Calinescu pour leur collaboration au projet

Références

- Noelling, G. et Bernfeld, P. (1948) Diastatic enzymes, III. β amylase: determination of activity and control of absence of α amylase, *Helv. Chim. Acta.* 31, 286-290.
- Bergmeyer, H.U., Gawehn, K., et Grassl, M. (1974) *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed) Volume 1, 2nd ed, 515-516, Academic Press, Inc., New York, NY.

Tri-enzyme gastro-resistant formulation based on Carboxylated High Amylose Starch excipients

Louis-Philippe Massicotte and Mircea-Alexandru Mateescu

Department of Chemistry and Biochemistry, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8
mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Abstract Summary

Pancreatic enzymes formulated as tablets with Carboxymethyl High Amylose Starch (CM-HAS) and Succinyl High Amylose Starch (S-HAS) displayed marked enzymatic activity after incubation in simulated gastric conditions contrarily to free (non-protected) enzymes. Both formulations with carboxylated starch can be used to protect enzymes through the gastro-intestinal tract for gut delivery.

Introduction

In pancreatitis the replacement of pancreatic enzymes is often required.

Protonated CM-HAS and S-HAS carriers are stable in acidic (gastric) medium, resulting in a compact structure. Furthermore, this ensures local (tablet surface surroundings) buffering properties and protection of the active agent against acidic denaturation. When in neutral or weak alkaline (intestinal) media, the protonated form will change the proton for cations (sodium), facilitating hydration and swelling, generating polymeric material dissolution, with release of the bioactive agent.

In this *in vitro* study, pancreatic enzymes (α -amylase, lipase and trypsin) were incorporated in CM-HAS and S-HAS. The aim of the study was to evaluate whether CM-HAS and S-HAS can provide protection of the enzyme bioactive agents against gastric acidity/pepsin denaturation and their liberation in the intestinal fluids.

Experimental Methods

Synthesis of polymeric derivatives

A quantity of 70 g of Hylon VII was dissolved for gelatinization in 150 ml of H₂O and stirred at 50 °C followed by the addition of 200 ml of NaOH 1.71 M.

CM-HAS: The synthesis was done as described [1] with minor modification as follows: the reaction medium was stirred for 20 min at 50 °C, then 45 mL of NaOH 10 M and 35 g of mono-chloroacetic acid (MCA) were added to the mixture and stirred for 1 h. The mixture was neutralized with acetic acid and cooled at room temperature.

S-HAS: The mixture was stirred at 50 °C for 70 min and the pH was adjusted to 8.0 with acetic acid. The mixture was cooled to room temperature and adjusted to 1.5L with H₂O. An amount of 16 g of succinic anhydride was added to the mixture while keeping the pH between 8.0 and 8.4. Once the pH is stabilized, the mixture was stirred for an additional 10 min.

In both syntheses, the resulting slurry was precipitated acetone, dried and the powder was recovered. Tablets (200 mg, 9 mm diameter, 2 mm thickness) were obtained by direct compression at 3.0 T with corresponding powder with the bioactive agent.

The degree of substitution was determined by potentiometric titration of CM groups with 0.2 M NaOH and expressed in mEquivalents of functional groups per gram (mEquiv/g) of polymeric powder.

Stability of pancreatic enzymes formulated with CM-HAS and S-HAS in simulated gastric fluid (SGF)

Tablets based on CM-HAS or S-HAS and containing 15 mg of each enzyme (839 EU / mg solid, 1180 EU / mg solid and 16000 units/mg solid, for α -amylase, lipase and trypsin, respectively) were placed individually in 50 mL of SGF pH 1.2 [2] containing pepsin for different times at 37 °C under agitation at 50 rpm. After various incubation times in SGF, the tablets were transferred into 50 mL of 50 mM phosphate buffer (PB) pH 7.2 and crushed before determining the enzymatic activities.

The α -amylase activity was determined by the reductimetric method of Noelling and Bernfeld [3], the trypsin activity was determined by the method of Bergmeyer and al. [4] and the lipase activity was determined by using olive oil as substrate.

Loading capacity of CM-HAS and S-HAS formulations

Tablets based on CM-HAS or S-HAS and containing 10, 40, 80, 120 and 160 mg of α -amylase were placed individually in 50 mL of SGF, for 1 h at 37 °C under agitation at 50 rpm, using an incubator shaker. After the appropriate incubation period in SGF, the tablets were transferred into PB and the amylolytic activity was determined as above.

Enzymes delivery in the simulated intestinal medium

Tablets based on CM-HAS or S-HAS and containing 15 mg of each enzyme were placed individually in 50 mL of SGF for 1 h and then transferred in PB at 37 °C, 50 rpm. Then, samples were taken at regular intervals to determine the enzymatic activities.

Results and Discussion

CM-HAS and S-HAS with a substitution degree of 0.94 and 1.22 mEquiv/g respectively were used as excipients for oral tablet formulation of bioactive agents.

The enzymatic assays showed that, when formulated with CM-HAS, the polymeric excipient was able to afford a substantial protection to all three enzymes against acidic denaturation over 2 h (Fig. 1). When formulated with CM-HAS, the enzymes conserved after 60 min 61-87% of the initial activity (Fig. 1a) while formulated with S-HAS, they conserved 74-96% of the initial activity (Fig. 1b) whereas for the free, unprotected enzymes, no activity at all was observed after 1h in SGF (data not shown).

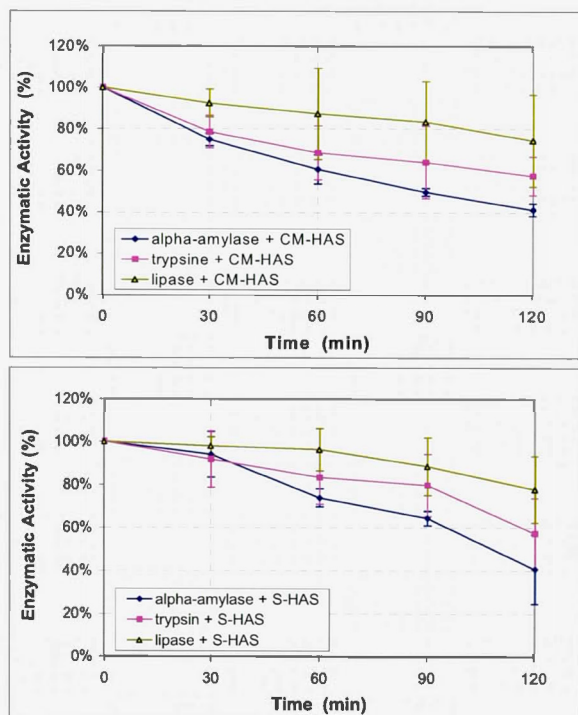


Fig. 1. Stability of α -amylase, lipase and trypsin formulated with (a) CM-HAS and (b) S-HAS in SGF (pH 1.2, with pepsin) ($n=3$).

It was found that tablets were in good shape and the enzymatic activities were preserved after 1 h incubation in SGF, even when loaded with 80 % active agent (i.e. α -amylase, Fig. 2). This aspect is important for further developments, showing a high loading capacity of these pharmaceutical formulations with CM-HAS or S-HAS.

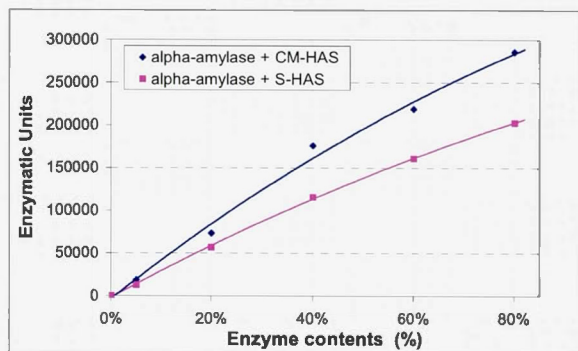


Fig. 2. Loading of α -amylase formulated with S-HAS and CM-HAS in SGF (pH 1.2, with pepsin).

For the liberation with enzymes formulated with S-HAS and CM-HAS, practically no enzymatic activities were detected after 1 h of liberation in SGF. The enzyme liberation from the CM-HAS tablets started after 2h in PB and more than 80% of activity in the medium was reached after 190 min of release (Fig 3a). In the case of S-HAS tablets, the liberation of enzymes started after 1 h

in PB and more than 80% of activity in the medium was reached after 170 min of release (Fig 3b).

The formation of a gel around the tablet may generate a delayed liberation which appears related to the swelling, erosion and dissolution of the tablet.

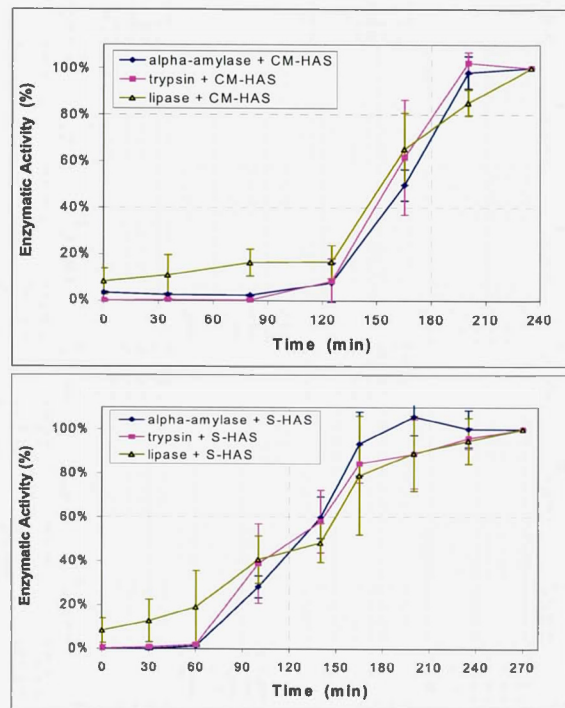


Fig. 3. Liberation of α -amylase, lipase and trypsin formulated with CM-HAS and S-HAS in PB solution ($n=4$).

Conclusion

CM-HAS and S-HAS both appear to be interesting excipients for protecting bioactive agents from the gastric degradation and allowing their delivery in the gut, opening interesting perspectives for oral therapeutic formulations.

References

- [1] C. Calinescu, J. Mulhbach, É. Nadeau, J. M. Fairbrother, M. A. Mateescu. *Eur. J. Pharm. Biopharm* 60, (2005) 53-60.
- [2] U. S. Pharmacopeia National Formulary U.S.P. XXIV, NF XIX, United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD, 2000.
- [3] G. Noelting, P. Bernfeld. *Helv. Chim. Acta*. 31 (1948) 286-290.
- [4] H.U. Bergmeyer, K. Gawehn, and M. Grassl. *Methods of Enzymatic Analysis* (H.U. Bergmeyer, ed) Volume I, 2nd ed. (1974), 515-516, Academic Press, Inc., New York, NY

Acknowledgement

Support from Valeo Inc. is gratefully acknowledged

Tri-enzyme gastroresistant formulation based on carboxylated high amylose starch excipients

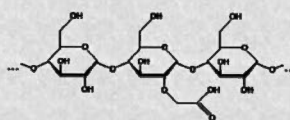
L-P. Massicotte, M.A. Mateescu

Department of Chemistry and BioMed Center, Université de Québec à Montréal
Montreal (Quebec), H3C 3P8, Canada

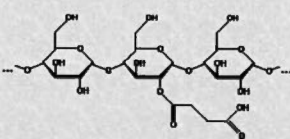
Introduction

Amylose is non-ramified polymer of glucose linked mainly by α 1,4 glucosidic bonds. Hylon VII (High Amylose Starch) is composed of 70% (or more) in amylose and up to 30% in amylopectin (α 1,4- and branching α 1,6-glucosidic bonds). The greater composition in amylose allows a better structure arrangement of the matrix and more interesting properties as excipient.

Carboxymethylated Starch (CM-HAS)



Succinylated Starch (S-HAS)



Experimental Section

The synthesis of modified starch: 70 g of Hylon VII was suspended in 150 mL of H_2O before being heated to $50^\circ C$ under constant agitation. A volume of 200 mL of 1.7 M NaOH was added to the mixture under continuing agitation for 60 min.

Synthesis of Succinylated Starch (S-HAS): the pH of the mixture was adjusted to 8.0 with acetic acid and the medium was cooled at room temperature and completed to 1.3 L with H_2O . An amount of 11 g of solid succinic anhydride was added to the mixture while keeping the pH between 8.0 and 8.4. After the pH stabilization, the mixture was left to react under stirring for 10 min.

Synthesis of Carboxymethylated Starch (CM-HAS): A volume of 45 mL NaOH 10 M and 36 g of mono-chloroacetic acid (MCA) were added to the reaction medium under constant agitation for 1 h, followed by neutralization at room temperature.

The gel was dried with acetone and the powder was recovered by filtration. Tablets of 200 mg each (diameter of 9 mm and a thickness of 2 mm) were obtained by direct compression at 3.0 tons from the mixed powders of the corresponding excipient and the bioactive agents

The determination of α -amylase activity was done by the reductimetric method of Noelting and Bernfeld [1] with dimethylsalicylic acid (DNS). The determination of the trypsin enzymatic activity was done according to Bergmeyer & al [2] by using a solution of Na-Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester (BAEE). Finally, the enzymatic activity of lipase was determined by titration of acid functions released by the degradation of olive oil (substrate).

Results

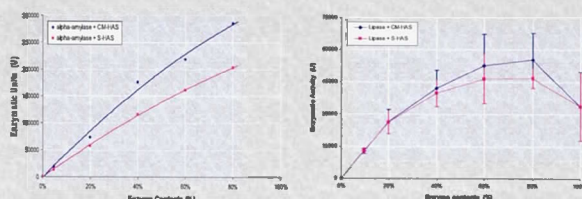


Fig.1: Remaining enzymatic activity after 1 h incubation in SGF, in function of CM-HAS or S-HAS tablets loading with α -amylase (A) and lipase (B).

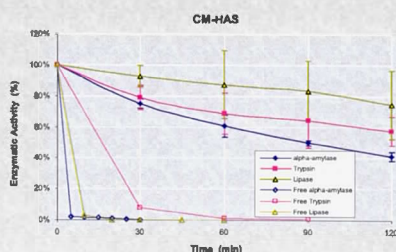


Fig.2: Enzymatic activity released from tablets made of CM-HAS containing 15 mg of α -amylase, 15 mg of lipase and 15 mg of trypsin, after various incubation times in SGF.

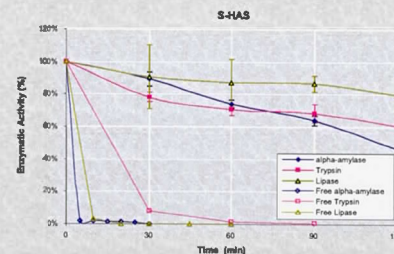


Fig.3: Enzymatic activity released from tablets made of S-HAS containing 15 mg of α -amylase, 15 mg of lipase and 15 mg of trypsin, after various incubation times in SGF.

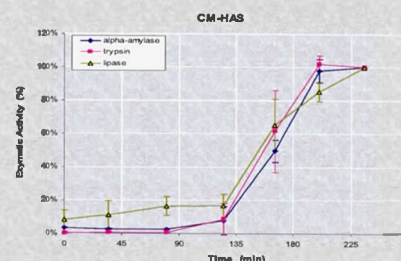


Fig.4: Enzymatic activity of α -amylase, lipase and trypsin released from tablets based on CM-HAS (containing 15 mg of each enzyme), in simulated intestinal fluid (SIF, 50 mM $Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4$ buffer pH 7.2) after 1 h incubation in SGF.

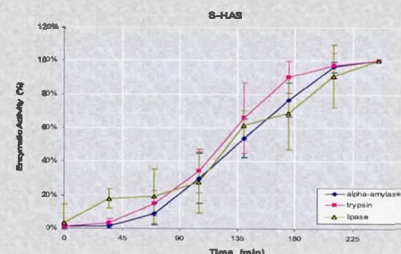


Fig.5: Enzymatic activity of α -amylase, lipase and trypsin released from tablets made of S-HAS (containing 15 mg of each enzyme), in SIF after 1 h incubation in SGF.

Conclusion

Resistance in acidic (SGF) medium: Carboxymethylated starch and succinylated starch provide a notable protection against acidic degradation for all three enzymes studied, even after 120 min incubation in SGF.

Release in neutral (SIF) medium: The enzymes formulated with succinylated starch and carboxymethylated starch reached 80% of their total activity after 3 h.

Loading capacity: All the tablets containing α -amylase kept their structural integrity after 1 h in SGF medium, even those containing 80% of active agent. For the tablets containing lipase, the enzymatic activity depended linearly up to 20% enzyme content and then showed a gradual loss of activity when the ratio enzyme:excipient raised. A high amount of active agent for a small mass of excipient represents a desirable quality for pharmaceutical formulations.

Acknowledgements

Gestion Valeo for financing of the project and Dr. Alain Richard for his interest and discussion.

Jérôme Mulhbach, Wilms E. Baille and Carmen Calinescu for their helpful collaboration.

References

- Noelting, G. et Bernfeld, P. (1948) Diastatic enzymes. III. β amylase; determination of activity and control of absence of α amylase. *Helv. Chim. Acta*, 31, 286-290.
- Bergmeyer, H.U., Gawehn, K., et Grassl, M. (1974) *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed) Volume 1, 2nd ed., 515-516, Academic Press, Inc., New York, NY.

Formulations gastro-résistantes d'enzymes pancréatiques avec des excipients à base d'amidon modifié

Louis-Philippe Massicotte, Mircea Alexandru Mateescu

Département de Chimie, Centre BioMed, Université du Québec à Montréal

Montréal (Québec), H3C 3P8, Canada

L'amidon riche en amylose (ARA) carboxyméthylé (CM-ARA) et l'amidon succinylé (S-ARA) peuvent être utilisés comme excipients pharmaceutiques pour la formulation d'agents bioactifs à administration orale en assurant leur transport à travers le milieu gastrique simulé. Les excipients étudiés: le CM-ARA et le S-ARA, présentaient un degré de substitution de 0,94 et 1,04 méq/g respectivement. Des comprimés ont été obtenus par compression directe des poudres de l'excipient et de trois enzymes pancréatiques: l' α -amylase, la lipase et la trypsine. Il a été montré que les deux excipients protègent les enzymes à travers le passage en milieu simulant l'acidité gastrique, ce qui ouvre des perspectives intéressantes pour des formulations pharmaceutiques. Les enzymes libres présentaient des activités négligeables (0 - 10%) après 30 minutes dans le milieu gastrique, tandis que les enzymes formulées possédaient 75 - 90% de leurs activités initiales après 1 h. Suite à une incubation de deux heures dans le milieu gastrique, les activités rémanentes étaient de 41 - 80% de leurs activités de départ. Ces résultats montrent le rôle protecteur des excipients face à la dénaturation en milieu acide. La libération des enzymes avait lieu en milieu neutre (intestinal) et celles-ci étaient libérées à différent temps: 180 min pour les formulations avec CM-ARA et 170 min pour S-ARA, pour atteindre 75% de l'activité maximale pour les enzymes formulées. En ce qui a trait à la capacité de charge des comprimés en éléments actifs, les composés contenant de l' α -amylase ont tous gardé leur intégrité pour plus d'une heure en milieu gastrique, même pour ceux contenant 80% d'actif. Une grande capacité de charge en élément actif est une qualité fort désirable pour un excipient, en assurant une bonne acceptabilité par les patients et un potentiel thérapeutique élevé pour une masse réduite de forme solide de dosage.

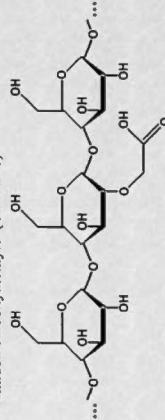
FORMULATIONS GASTRO-RÉSISTANTES D'ENZYMES PANCRÉATIQUES AVEC DES EXCIPIENTS À BASE D'AMIDON MODIFIÉ

L.-P. Massicotte, M.A. Mateescu
Département de Chimie et Centre BioMed, Université du Québec à Montréal, Montréal (Québec), H3C 3P8, Canada

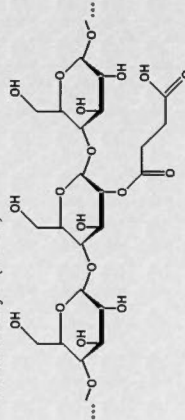
Introduction

L'amylase est un polymère non ramifié contenant jusqu'à 6000 unités d'anhydroglucose liées par des liaisons α 1,4-D-glucosidiques. En contraste, l'amyllopectine a une masse moléculaire approximativement 1000 fois plus élevée que celle de l'amylase et comprend de nombreux polyglucosides branchés par des liens α 1,6-D-glucosidiques. Le Hylon VII (High Amylose Starch) est composé de 70% (ou plus) d'amylase. La teneur plus élevée en amylose, par rapport à l'amidon, permet un meilleur arrangement physiques de la matrice et ainsi des meilleures propriétés comme excipient.

Amidon carboxyméthylé (CM-HAS)



Amidon succinylé (S-HAS)



Partie Expérimentale

La synthèse de l'amidon modifié: 70 g de Hylon VII ont été dissous dans 150 mL d'eau avant d'être amenés à 50 °C sous agitation constante et 13,7 g de NaOH dissous dans 200 mL H₂O ont été ajoutés au mélange sous agitation pendant 60 min pour la gélatinisation.

Pour la synthèse de l'amidon succinylé: le pH a été ajusté à 8,0 avec de l'acide acétique et le milieu a été refroidi et complété à 1,3 L avec de l'H₂O. Une quantité de 11 g d'anhydride succinique solide a été ajoutée au mélange tout en gardant le pH entre 8,0 et 8,4. Après la stabilisation du pH, le mélange a été laissé réagir sous agitation pendant 10 min.

Pour la synthèse de l'amidon carboxyméthylé: 45 mL de NaOH 10 M et 36 g d'acide monochloroacétique (MCA) ont été ajoutés au milieu réactionnel, maintenant sous agitation pendant 1 h suivi par neutralisation à la température de la pièce.

Le séchage a été fait à l'acétone et la poudre a été récupérée par filtration. Des comprimés (diamètre de 9 mm et épaisseur de 2 mm) de 200 mg ont été obtenus par compression à 3,0 T à partir des poudres des excipients et des agents bioactifs correspondants.

La détermination de l'activité de l' α -amylase a été effectuée par la méthode réductométrique de Noelling et Bernfield, en utilisant l'acide diminosalicylique (DNS), la détermination de l'activité de la trypsine a été faite selon Bergmeyer et al. en utilisant une solution de Na-Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester (BAEE) et la détermination de l'activité de la lipase a été faite par le titrage des fonctions acide libérées, en utilisant l'huile d'olive comme substrat.

Résultats

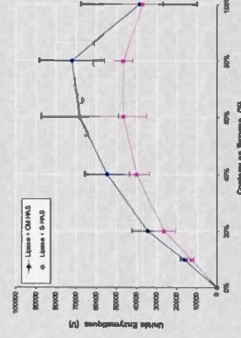
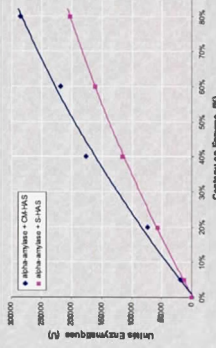


Fig.1: Détermination de l'activité enzymatique en fonction de la capacité de charge en α -amylase (A) et en lipase (B) dans des comprimés à base d'amidon carboxyméthylé ou succinylé, après 1 h d'incubation dans le SGF.

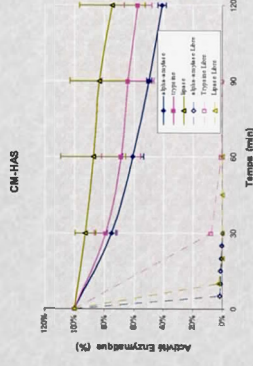


Fig.2: Détermination de l'activité enzymatique libérée à partir de comprimés à base d'amidon carboxyméthylé contenant 15 mg d' α -amylase, 15 mg de lipase et 15 mg de trypsine, après différents temps d'incubation dans une solution acide simulant le fluide gastrique (SGF).

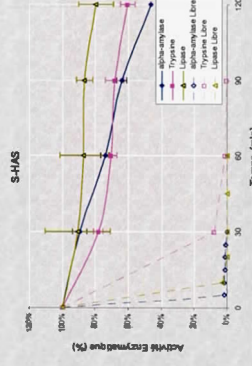


Fig.3: Détermination de l'activité enzymatique libérée à partir de comprimés à base d'amidon succinylé contenant 15 mg d' α -amylase, de lipase et de trypsine après différents temps d'incubation dans une solution acide simulant le fluide gastrique (SGF).

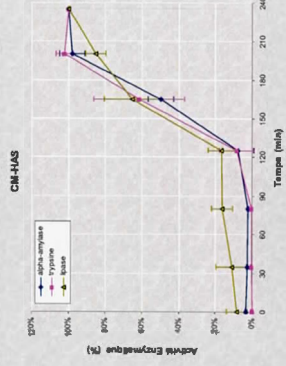


Fig.4: Détermination de l'activité de l' α -amylase, de la lipase et de la trypsine libérées par des comprimés à base d'amidon carboxyméthylé ou succinylé, contenant 15 mg de chaque enzyme, dans un tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,2, 50 mM) après 1 h d'incubation dans le SGF.

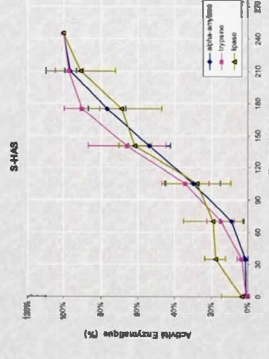


Fig.5: Détermination de l'activité de l' α -amylase, de la lipase et de la trypsine libérées par des comprimés à base d'amidon carboxyméthylé ou succinylé, contenant 15 mg de chaque enzyme, dans un tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,2, 50 mM) après 1 h d'incubation dans le SGF.

Conclusion

Résistance en milieu acide: L'amidon carboxyméthylé et l'amidon succinylé donnent une protection notable contre la dénaturation des trois enzymes pancréatique, même après 120 min en milieu acide.

Libération en milieu neutre: Le relargage dans le milieu à pH 7,2 des enzymes formulées avec des comprimés d'amidon succinylé montre 80% de l'activité totale après 170 min, par rapport à 180 min dans le cas de l'amidon carboxyméthylé.

Capacité de chargement: Les comprimés contenant de l' α -amylase ont tous gardé leur intégrité pour une durée de 1 h en milieu SGF, même pour ceux contenant 80% d'élément actif, tandis que pour la lipase la linéarité est gardée jusqu'à 20% d'élément actif.

Une grande teneur en élément actif pour une masse réduite du comprimé représente une qualité désirable pour une formulation pharmaceutique.

Remerciements

Valéo pour le financement du projet
Jérôme Mühlbacher, Wilma Einmann Baile et Carmen Calinescu pour leur collaboration au projet

Références

Bergmeyer, H.U., Gawehn, K., et Grassl, M. (1974) *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed) Volume 1, 2nd ed., 515-516, Academic Press, Inc., New York, NY
Noelling, G. et Bernfield, P. (1948) Diastatic enzymes. III. β amylase: determination of activity and control of absence of α amylase. *Helv. Chim. Acta* 31, 286-290.
U. S. Pharmacopoeia National Formulary U.S.P. XXIV, NF XXIV, United States Pharmacopoeial Convention Inc., Rockville, MD, 20800.

BIBLIOGRAPHIE

* * * 2000. Dans *U.S. Pharmacopeia National Formulary*, U.S.P. XXIV, NF XIX, p. 2235, Rockville (MD), United States Pharmacopeial Convention Inc.

Allen E.E. Jr., Smit J.A., Walter R.R., Jansma R.H., 1975. "Half amide-half ammonium salts or alpha-olefin-maleic anhydride copolymers". Brevet États-Unis 3 868 353.

Anderson L.A., 1967. "Solid composition containing fat-soluble vitamins and processes for making it". Brevet Grande-Bretagne 1 072 795.

Baghurst P.A., Baghurst K.I., Record S.J., 1996. "Dietary fibre, non-starch polysaccharides and resistant starch - a review". *Food Aust.*, vol. 48, p. S3-S35.

Beisson F., Tiss A., Rivière C., Verger R., 2000. "Methods for lipase detection and assays: a critical review". *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 102, p. 133-153.

BeMiller J.N., 1973. "Starch amylose" dans *Industrial Gums – Polysaccharides and their derivatives* (Whistler R.L., BeMiller J.N., Eds.), p. 545-566, New York and London, Academic Press.

Bergmeyer H.U., Gawehn K., Grassl M., 1974. "Trypsin" dans *Methods of Enzymatic Analysis, Volume I, 2nd edn* (H.U. Bergmeyer (ed.)), p. 515-516, New York (NY), Academic Press Inc.

Best C.H., Taylor N.B., 1961. "Pancreas, liver and biliary system" dans *The Physiological basis of medical practice* (Taylor N.B., Ed.), p. 629-661, Baltimore, The Williams & Wilkins company.

Beveridge A.J., 1996. "A theoretical study of the active sites of papain and S195C rat trypsin: Implications for the low reactivity of mutant serine proteinases". *Protein Sci.*, vol. 5, p. 1355-1365.

Borgström B., Erlanson C., 1973. "Pancreatic lipase and co-lipase. Interactions and effects of bile salts and other detergents". *Eur. J. Biochem.*, vol. 37, p. 60-68.

Brayer G.D., Luo Y., Withers S.G., 1995. "The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes". *Protein Sci.*, vol. 4, p. 1730-1742.

Brobeck J.R., 1979. "Pancreatic secretion" dans *Best & Taylor's Physiological basis of medical practice - 10th edition* (Brobeck J.R., Ed.), p. 2-56-2-66, Baltimore, The Williams & Wilkins company.

Brokerhoff H., Jensen R.G., 1974. "Lipases" dans *Lipolytic Enzymes* (Brokerhoff H., Jensen R., Eds.), p. 25-34, New York, Academic Press.

Brown J.P., McGarraugh G.V., Parkinson T.M., Wingard R.E., Onderdonk A.B., 1983. "A polymeric drug for treatment of inflammatory bowel disease". *J. Med. Chem.*, vol. 26, p. 1300-1307.

Bryant A.P., 1933. "Method of making starch". Brevet États-Unis 1 937 543.

Buléon A., Colonna P., Planchot V., Ball S., 1998. "Starch granules: structure and biosynthesis". *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 23, p. 85-112.

Calinescu C., Mulhbach J., Nadeau E., Fairbrother J.M., Mateescu M.A., 2005. "Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 60, p. 53-60.

Carlson C.F., 1942. "Electrophotography", Brevet États-Unis 2 297 691

Cartilier L., Mateescu M.A., Dumoulin Y., Lenaerts V., 1997. "Cross-linked amylose as a binder/disintegrant in tablets". Brevet États-Unis 5 616 343.

Cassidy A., Bigham S.A., Cummings J.H., 1994. "Starch intake and colorectal cancer risk: an international comparison". *Br. J. Cancer*, vol. 69, p. 937-942.

Chen J., Anderson J.B., DeWeese-Scott C., Fedorova N.D., Geer L.Y., He S., Hurwitz D.I., Jackson J.D., Jacobs A.R., Lanczycki C.J., Liebert C.A., Liu C., Madej T., Marchler-Baue R.A., Marchler G.H., Mazumder R., Nikolskaya A.N., Rao B.S., Panchenko A.R., Shoemaker B.A., Simonyan V., Song J.S., Thiessen P.A., Vasudevan S., Wang Y., Yamashita R.A., Yin J.J., Br Yant S.H., 2003. "MMDB: Entrez's 3D-structure database". *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, p. 474-477.

Cherry I. S., Crandall L. A., 1932. "The specificity of pancreatic lipase: Its appearance in the blood after pancreatic injury". *Am. J. Physiol.*, vol. 100, p. 266-273.

Choi J.Y., Muallem D., Kiselyov K., Lee M.G., Thomas P.J., Muallem S., 2001. "Aberrant CFTR-dependent HCO_3^- transport in mutations associated with cystic fibrosis". *Nature*, vol. 410, p. 94-97.

Chourasia M.K., Jain S.K., 2004. "Polysaccharides for colon targeted drug delivery". *Drug Deliv.*, vol. 11, p. 129-148.

Chowhury J.K., 1924. "Esters of polysaccharides with hydroxy acids". *Biochem. Z.*, vol. 76, p. 148.

Craig G., Evans W.G., Potts E.L. Jr., 1976. "Starch/latex cast coatings for paper". Brevet Allemagne 2 619 848.

Czako L., Takacs T., Hegyi P., Pronai L., Tulassay Z., Lakner L., Dobronte Z., Boda K., Lonovics J., 2003. "Quality of life assessment after pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis". *Can. J. Gastroenterol.*, vol. 17, p. 597-603.

Dumoulin Y., Cartilier L.H., Mateescu M.A., 1998. "Cross-linked amylose tablets containing α -amylase: an enzymatically-controlled drug release system". *J. Control. Release*, vol. 60, p. 161-167.

Dumoulin Y., Clement P., Mateescu M.A., Cartilier L., 1994. "Cross-linked amylose as a binder/disintegrant in compressed tablets". *STP Pharma Sci.*, vol. 4, p. 329-335.

Eckert R., Randall D., Burggren W., French K., 1999. "Acquisition de l'énergie: nutrition, digestion et métabolisme" dans *Physiologie animale - Mécanismes et adaptations*. (Eckert R., Randall D., Burggren W., French K., Eds.), p. 627-664, Bruxelles, De Boeck Université.

Edge S., Steele D.F., Staniforth J.N., Chen A., Woodcock P.M., 2002. "Powder compaction properties of sodium starch glycolate disintegrants". *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 28, p. 989-999.

Egloff M.P., Sarda L., Verger R., Cambillau C., Tilbeurgh H.V., 1995. "Crystallographic study of the structure of colipase and of the interaction with pancreatic lipase". *Protein Sci.*, vol. 4, p. 44-57.

Fang J.M., Fowler P.A., Tomkinson J., Hill C.A.S., 2002. "The preparation and characterisation of a series of chemically modified potato starches". *Carbohydr. Polym.*, vol. 47, p. 245-252.

Feizi T., Fazio F., Chai W., Wong C., 2003. "Carbohydrate microarrays - a new set of technologies at the frontier of glycomics". *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 13, p. 637-645.

Fletcher P.D. I., Robinson B.H., Freeman R.B., Oldfield C., 1985. "Activity of lipase in water-in-oil microemulsions". *J. Chem. Soc.*, vol. 81, p. 2667-2679.

Gella F.J., Gubern G., Vidal R., Canalias F., 1997. "Determination of total and pancreatic alpha-amylase in human serum with 2-chloro-4-nitrophenyl-alpha-D-maltotrioside as substrate". *Clin. Chim. Acta*, vol. 259, p. 147-160.

Gibson G.R., Roberfroid M.B., 1995. "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics". *J. Nutra.*, vol. 125, p. 1401-1412.

Green C.J., Treier G., MacClaren R.H., 1972. "Elektrofotografisches Kopierpapier". Brevet Allemagne 2 132 017.

Greenblatt D.J., 2006. "Pharmacokinetic determinants of hypnotic drug action: The art and science of controlling release". *Sleep Med.*, suppl. 1, p. S10-14 (Epub).

Gwan Y.K., Eun S. P., Kim K., Chin I.J., Yoon J.S., 2004. "Synthesis of starch-g-poly(glycidyl methacrylate) and its blending with poly(ϵ -caprolactone) and nylon 610". *Macromol. Symp.*, vol. 224, p. 333-342.

Heinze T., Talaba P., Heinze U., 2000. "Starch derivatives of high degree of functionalization. 1. Effective homogeneous synthesis of p-toluenesulfonyl (tosyl) starch with a new functionalization pattern". *Carbohydr. Polym.*, vol. 42, p. 411-420.

Henry R.J., Sobel C., Berkman S., 1957. "On the Determination of 'Pancreatitis Lipase' in Serum". *Clin. Chem.*, vol. 3, p. 77-89.

Herold M., Hofman J., Málek P., Čapkova J., Heřmanský M., Vondráček M., Kolc J., 1959. Brevet Tchèque 90 981.

Hjermstad E.T., 1973. "Starch hydroxyethyl ether and other starch ethers" dans *Industrial Gums - Polysaccharides and their derivatives* (Whistler R.L., BeMiller, Eds.), p. 601-612, New York and London, Academic Press.

Ho F.F.L., Kohler R.R., Ward G.A., 1972. "Determination of Molar Substitution and Degree of Substitution of Hydroxypropyl Cellulose by Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry". *Anal. Chem.*, vol. 44, p. 178-181.

Hofreiter B.T., 1986. "Miscellaneous modifications" dans *Modified Starches: Properties and uses* (Wurzburg O.B., Ed.), p. 179-196, Boca Raton (Florida), CRC Press Inc.

Holst A., Kostrzewa M., Buchberger G., 1978. "Verfahren zur Herstellung von saugfähigen, modifizierten Stärkeäthern und deren Verwendung". Brevet Allemagne 2 634 539.

Imberty A., Chanzy H., Pérez S., 1988. "The double-helical nature of the crystalline part of A-starch". *J. Mol. Biol.*, vol. 201, p. 365-378.

Ishida T., Kato S., 2004. "Role of Asp102 in the catalytic relay system of serine proteases: a theoretical study". *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, p. 7111-7118.

Ispas-Szabo P., Calinescu C., Mateescu M.A., 2006. "Gastro-Resistant Oral Dosages Based on Carboxymethyl High Amylose Starch". Transactions of 33rd Meeting of Controlled Release Society, Abstr. 843.

Ispas-Szabo P., Ravenelle F., Hassan I., Preda M., Mateescu M.A., 2000. "Structure-properties relationship in cross-linked high amylose starch for use in controlled drug release". *Carbohydr. Res.*, vol. 323, p. 163-175.

Jain R.A., 2000. "The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices". *Biomaterials*, vol. 21, p. 2475-2490.

Jarowenko W., 1986. "Acetylated starch and miscellaneous organic esters" dans *Modified Starches: Properties and uses* (Wurzburg O.B., Ed.), p. 55-77, Boca Raton (Florida), CRC Press Inc.

Kim C.J., Lee P.I., 1992. "Composite Poly(vinyl alcohol) Beads for Controlled Drug Delivery". *Pharm. Res.*, vol. 9, p. 10-16

Klein H., Hoepke C.H., Mueller A., 1969. "Mittel zur Appretur und Saugwerterhoehung fuer Gewebe und Gewirke". Brevet Allemagne 1 296 598.

Kohri N., Mori K., Miyazaki K., Arita T., 1986. "Sustained release of nifedipine from granules". *J. Pharm. Sci.*, vol. 75, p. 57-61.

Konigsberg M., 1950. "Ungelatinized starch ethers from polyfunctional etherifying agents". Brevet États-Unis 2 500 950.

Korhonen O., Raatikainen P., Harjunen P., Nakari J., Suihko E., Peltonen S., Vidgren M., Paronen P., 2000. "Starch acetates - multifunctional direct compression excipients". *Pharm. Res.*, vol. 17, p. 1138-1143.

Kost J., Shefer S., 1990. "Chemically-modified polysaccharides for enzymatically-controlled oral drug delivery". *Biomaterials*, vol. 11, p. 695-698.

Kragten E.A., Leeftang B.R., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G., 1992. "¹H-N.m.r. spectroscopy of O-carboxymethyl derivatives of D-glucose". *Carbohydr. Res.*, vol. 228, p. 433-437.

Krogel I., Bodmeier R., 1999. "Evaluation of an enzyme-containing capsular shaped pulsatile drug delivery system". *Pharm. Res.*, vol. 16, p. 1424-1429.

Laemmli U.K., 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*, vol. 227, p. 680-685.

Lalush I., Bar H., Zakaria I., Eichler S., Shimoni E., 2005. "Utilization of amylose-lipid complexes as molecular nanocapsules for conjugated linoleic Acid". *Biomacromolecules*, vol. 6, p. 121-130.

- Langer R., 1990. "New methods of drug delivery". *Science*, vol. 249, p. 1527-1533.
- Layer P., Keller J., 1999. "Pancreatic Enzymes: Secretion and Luminal Nutrient Digestion in Health and Disease". *J. Clin. Gastroenterol.*, vol. 28, p. 3-10.
- Layer P., Keller J., Lankisch P.G., 2001. "Pancreatic enzyme replacement therapy". *Curr. Gastroenterol. Rep.*, vol. 3, p. 101-108.
- Lenaerts V., Dumoulin Y., Mateescu M.A., 1991. "Controlled-release of theophylline from cross-linked amylose tablets". *J. Control. Release*, vol. 15, p. 39-46.
- Lenaerts V., Moussa I., Dumoulin Y., Mebsout F., Chouinard F., Szabo P., Mateescu M.A., Cartilier L., Marchessault R.H., 1998. "Cross-linked high amylose starch for controlled release of drugs: recent advances". *J. Control. Release*, vol. 53, p. 225-234.
- MacGregor E.A., Greenwood C.T., 1980. "Polysaccharides" dans *Polymers in Nature* (MacGregor E.A., Greenwood C.T., Eds.), p. 240-328, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, John Wiley & Sons Ltd.
- Mäkia R., Suihkoa E., Korhonena O., Pitkänena H., Niemib R., Lehtonenb M., Ketolainen J., 2006. "Controlled release of saccharides from matrix tablets". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 62, p. 163-170.
- Mani I., Shand A.P., Franklin E., Potter J.I., 1975. "In hohem Grade monodispergierte Latices von nicht-filmbildenden Polymerisaten und Verfahren zu ihrer Herstellung". Brevet Allemagne 2 524 733.
- Mateescu M.A., Ispas-Szabo P., Mulhbach J., 2006. "Cross-linked starch derivatives for highly loaded pharmaceutical formulations" dans *Polyysaccharides for drug delivery and pharmaceutical applications - ACS Symposium Series 934* (Marchessault R., Ravenelle F., Zhu X.X., Eds.), p. 121-137, Philadelphia, Oxford University Press.

Mateescu M.A., Lenaerts V., Dumoulin Y., 1994. "Crosslinked material for controlled release of biologically active compounds". Brevet Canada 2 041 774 (1995, brevet États-Unis 5 456 921).

Mateescu M.A., Schell H.D., 1983. "A new amyloclastic method for the selective determination of alpha-amylase". *Carbohydr. Res.*, vol. 124, p. 319-323.

Mateescu M.A., Schell H.D., Enache E., Valsanescu T., Bentia T., Petrescu A., Zarchievi V., Rotaru C., 1985. "Selective determination of alpha-amylase with cross-linked substrate tablets". *Anal. Lett.*, vol. 18, p. 79-91.

Mehlretter C.L., Roth W.B., 1968. "Color imparting complexes of starch ethers for swimming pools". Brevet États-Unis 3 414 515.

Minamiura N., 1988. "Human salivary and pancreatic α -amylase" dans *Handbook of amylases and related enzymes* (Yamamoto T.K. S., Ed.), p. 18-22, Tokyo, Pergamon Press.

Moussa I.S., Cartilier L.H., 1996. "Characterisation of moving fronts in cross-linked amylose matrices by image analysis". *J. Control. Release*, vol. 42, p. 47-55.

Mulhbacher J., Ispas-Szabo P., Lenaerts V., Mateescu M.A., 2001. "Cross-linked high amylose starch (CLHAS) derivatives as matrices for controlled release of high drug loadings". *J. Control. Release*, vol. 76, p. 51-58.

Mulhbacher J., Mateescu M.A., Calinescu C., 2004. "Composition comprising polymeric material and uses thereof". Brevet Canada 60/542219

Noelting G., Bernfeld P., 1948. "Diastatic enzymes. III. α -amylase: determination of activity and control of absence of α -amylase". *Helv. Chim. Acta*, vol. 31, p. 286-290.

Parker R., Ring S.G., 2001. "Aspects of the physical chemistry of starch". *J. Cereal Sci.*, vol. 34, p. 1-17.

Pohja S., Suihko E., Vidgren M., Paronen P., Ketolainen J., 2004. "Starch acetate as a tablet matrix for sustained drug release". *J. Control. Release*, vol. 94, p. 293-302.

Price N.C., Stevens L., 1984. "Introduction" dans *Fundamentals of Enzymology* (Price N.C., Stevens L., Eds.), p. 1-14, New York, Oxford University Press.

Ramakrishna B.S., Venkataraman S., Srinivasan P., Dash P., Young G.P., Binder H.J., 2000. "Amylase-resistant starch plus oral rehydration solution for cholera". *N. Engl. J. Med.*, vol. 342, p. 308-313.

Ravenelle F., Marchessault R.H., Légaré A., Buschmann M.D., 2002. "Mechanical properties and structure of swollen crosslinked high amylose starch tablets". *Carbohydr. Polym.*, vol. 47, p. 259-266.

Raving L.J., Baldinus J.G., Mazur M.L., 1962. "Effect of sulfate content of several anionic polymers on in vitro activity of pepsin". *J. Pharm. Sci.*, vol. 51, p. 857-860.

Roberts E.J., Rowland S.P., 1967. "Effects of selected reaction conditions and structural variations on the distribution of 2-(diethylamino)ethyl groups on D-glucopyranosyl residues of 2-(diethylamino)-ethylated cellulose, starch, and anomers of methyl 4,6-O-benzylidene-D-glucopyranoside". *Carbohydr. Res.*, vol. 5, p.1-12.

Roper H., 1996. "Application of starch and its derivatives". *Carbohydr. Eur.*, vol. 15, p. 14-21.

Rudnik E., Matuschek G., Milanov N., Kettrup A., 2005. "Thermal properties of starch succinates". *Thermochim. Acta*, vol. 427, p. 163-166.

Russell C.R., Buchanan R.A., Rist C.E., 1964. "Cellulosic pulps comprising crosslinked xanthate cereal pulps and products made therewith". Brevet États-Unis 3 160 552.

Rutenberg M.W., Jarowenko W., 1962. "Improvements in and relating to amylose sponges and gauze". Brevet Grande-Bretagne 900 868.

Saffran M., Kumar G., Savariar C., Burnham J., Williams F., Neckers D., 1986. "A new approach to the oral administration of insulin and other peptide drugs". *Science*, vol. 233, p. 1081-1084.

Sajilata M.G., Singhal R.S., Kulkarni P.R., 2006. "Resistant Starch - A Review". *Comprehensive Reviews in food science and food safety*, vol. 5, p. 1-17.

Samland H., Schulz P., 1967. Brevet Allemagne 54 684.

Sarda L., Marchis-Mouren G., Constantin M., Desnuelle P., 1957. "Sur quelques essais de purification de la lipase pancréatique". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 23, p. 264-274.

Schell H. D., Mateescu M.A., Bentia T., Jifcu A., 1981. "Alpha-amylase purification and separation from glucoamylase by affinity chromatography on cross-linked amylose". *Anal. Letters*, vol. 14, p. 1501-1514.

Schickaneder E., Hösel W., Eltzl H. v. d., Geuß U., 1988. "Casein-resorufin, a new substrate for a highly sensitive protease assay". *Fresenius Z. Anal. Chem.*, vol. 330, p. 360.

Serban M., Shell H.D., Mateescu M.A., 1975. "Preparation and properties of new amylose based carriers for exclusion chromatography". *Rev. Roum. Biochim.*, vol. 12, p. 187-191.

Seymour R.B., Carraher C.E. Jr., 1981. "Naturally Occuring Polymers" dans *Polymer Chemistry* (Seymour R.B., Carraher C.E. Jr, Eds.), p. 155-162, New York and Basel, Marcel Dekker Inc.

Shah U., Augsburger L., 2002. "Multiple sources of sodium starch glycolate, NF: Evaluation of functional equivalence and development of standard performance tests". *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 7, p. 345-359.

Shiftan D., Ravenelle F., Mateescu M.A., Marchessault R.H., 2000. "Change in V/B polymorph ratio and T₁ relaxation of epichlorohydrin crosslinked high amylose starch excipient". *Stärke / Starch*, vol. 52, p. 186-195.

Shiroza T., Furihata K., 1982. "The structures of diethylaminoethylated glucose and oligosaccharides derived from cationic starch". *Agric. Biol. Chem.*, vol 46, p. 1425.

Solarek D.B., 1986. "Cationic starches" dans *Modified Starches: Properties and uses* (Wurzburg O.B., Ed.), p. 113-129, Boca Raton (Florida), CRC Press Inc.

Stevens M.P., 1990. "Natural Polymers" dans *Polymer Chemistry: An Introduction Second Edition* (Stevens M.P., Ed.), p. 553-571, New York, Oxford University Press.

Swarbrick J., Boylan J., 1990. "Controlled- and Modulated-release Drug-Delivery Systems" dans *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (Swarbrick J., Ed.), p. 281-313, New York, Marcel Dekker, Inc.

Tee-Pak Inc., 1966. Brevet Pays-Bas 6 512 208.

Thiebaud S., Aburto J., Alric I., Borredon E., Bikaris D., Prinos J., Panayiotou C., 1997. "Properties of fatty-acid esters of starch and their blends with LDPE". *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 65, p. 705-721.

Thrash T., 1995. "Controlled-Release Drug Delivery Systems: Mechanisms of Intestinal-Specific Polymeric Degradation". *The Journal of The Denison Chemical Society*, vol. 1, p. 5-9.

Toppila S., Renkonen R., Penttilä L., Natunen J., Salminen H., Helin J., Maaheimo H., Renkonen O., 1999. "Enzymatic synthesis of α 3'sialylated and multiply α 3fucosylated biantennary polylactosamines". *Eur. J. Biochem.*, vol. 261, p. 208-215.

Trifan A., Balan G., Stanciu C., 2001. "Pancreatic enzymes replacement therapy in chronic pancreatitis: an update". *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.*, vol. 105, p. 646-650.

Trubiano P.C., 1986. "Succinate and substituted succinate derivatives of starch" dans *Modified Starches: Properties and uses* (Wurzburg O.B., Ed.), p. 131-147, Boca Raton (Florida), CRC Press Inc.

Twardowski J., Swierczynaki W., Krawczyk J., Jozefowicz W., Szczerbinski J., Adolf E., Urbanska Z., Bernacka M., 1976. Brevet Pologne 88 666.

Valsanescu T., Mateescu M.A., 1985. " 'All-reagent' tablet-test and method for rapid and selective alpha-amylase iodometric determination". *Anal. Biochem.*, vol. 146, p. 299-306.

Vander A.J., Sherman J.H., Luciano D.S., Brière R., 1995 (a). "Énergie et métabolisme cellulaire" dans *Physiologie Humaine - Troisième édition* (Vander A.J., Sherman J.H., Luciano D.S., Brière R., Ed.), p. 79-103, Montréal, Les Éditions de la Chenelière inc.

Vander A.J., Sherman J.H., Luciano D.S., Brière R., 1995 (b). "La digestion et l'absorption des aliments" dans *Physiologie Humaine - Troisième édition* (Vander A.J., Sherman J.H., Luciano D.S., Brière R., Eds.), p. 537-574, Montréal, Les Éditions de la Chenelière inc.

Verger R., DeHass R., Sarda L., Desnuelle P., 1969. "Purification from porcine pancreas of two molecular species with lipase activity". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 188, p. 272-282.

Walters W.Z., Shillingbury M.F., 1971. "Antitrust paper". Brevet États-Unis 3 565 681.

Walton A.G., Blackwell J., 1973. "The polysaccharides" dans *Biopolymers* (Walton A.G., Blackwell J., Eds.), p. 464-513, New York, Academic Press Inc.

Wang C.C., Grassman M.I., Ivy A.C., 1950. "Physiological properties of sodium carboxymethyl starch". *J. Nutr.*, vol. 40, p. 471-482.

Whitcomb D.C., 2004. "Pancreatitis". *NIH Publication*, vol. 4, p. 1596.

Wu J.T., Miya T., Knight J.A., 1983. "Determination of calcium concentration in pancreatic juice with the Corning 940 calcium titrator". *Clin. Chem.*, vol. 29, p. 745.

Wurzburg O.B., 1986. "Introduction" dans *Modified Starches: Properties and uses* (Wurzburg O.B., Ed.), p. 3-16, Boca Raton (Florida), CRC Press Inc.

Wurzburg O.B., 1986. "Modified Starches: Properties and uses" (Wurzburg O.B., Ed.), p. 132-136 et p. 187-188, Boca Raton (Florida), CRC Press Inc.

Yoshida S., 1974. Brevet Japon 74/11.787.

Zallie J.P., 1989. "The Role and Function of Specialty Starches in the Confection Industry". Technical Articles, National Starch and Chemical Corporation.

Zhang J., Wu D., Li D., Li G., 1992. "Study on substituent group distribution of carboxymethyl starch ether by nuclear magnetic resonance". *Huaxue Shijie*, vol. 33, p. 129-131.

Zhong Q., Glatz C.E., 2006. "Enzymatic assay method for evaluating the lipase activity in complex extracts from transgenic corn seed". *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, p. 3181-3185.